

***In vivo* Effekte des Makrophagen stimulierenden Lipopeptids
MALP-2 aus *Mycoplasma fermentans*:
Induktion von Leukozyteninfiltration
und Endotoxintoleranz**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von
Ursula Deiters
aus Hannover

1. Referent: Prof. Dr. P. F. Mühlradt

2. Referent: Prof. Dr. U. Panten

eingereicht am: 03.06.1999

mündliche Prüfung (Disputation) am: 19.08.1999

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch die Mentorin oder den Mentor/die Betreuerin oder den Betreuer der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikation

Deiters, U., Mühlrad, P. F.: Mycoplasmal lipopeptide MALP-2 induces the chemoattractant proteins macrophage inflammatory protein 1 α (MIP-1 α), monocyte chemoattractant protein 1, and MIP-2 and promotes leukocyte infiltration in mice.
Infection and Immunity, in press (1999)

Tagungsbeiträge

Mühlrad, P. F., Deiters, U., Kieß, M., Meyer, H., Süßmuth, R., Jung, G.: Mycoplasmal lipopeptides with endotoxin-like activity. (Poster) 50. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, 25. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Infektiologie, Berlin (1998)

Deiters, U.: Chemokin-Induktion durch Mykoplasmen. (Vortrag) 21. Arbeitstagung norddeutscher Immunologen, Borstel (1998)

Braunschweig, 28.05.1999

Die vorliegende Arbeit wurde unter wissenschaftlicher Leitung von Prof. Dr. P. F. Mühradt in der Arbeitsgruppe „Immunbiologie“ der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) in Braunschweig durchgeführt. Die Tierversuche wurden durch die Bezirksregierung Braunschweig im März 1997 unter dem Aktenzeichen 604.42502/07-01.97 genehmigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. P. F. Mühradt für das interessante Thema, die zahlreichen Anregungen und die motivierende Betreuung.

Herrn Prof. Dr. U. Panten danke ich für die bereitwillige Übernahme des Koreferats.

Weiterhin danke ich allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe "Immunbiologie" für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die stetige Hilfsbereitschaft.

Bei Frau M. Höxter (GBF) bedanke ich mich für ihre Hilfe am FACS. Frau E. Müller und Herrn Dr. M. Rohde (GBF) danke ich für die elektronenmikroskopische Charakterisierung der Liposomen. Mein Dank gilt weiterhin Herrn Dr. Barsig (Novartis, Wien) für die Durchführung des KC-ELISAs, Frau G. Sonntag und Herrn Prof. Dr. O. Götze (Georg-August-Universität Göttingen) für die praktische und theoretische Hilfe bei den Versuchen zur Komplement-aktivierung sowie Herrn Dr. H. Ronneberger (Hoechst Marion Roussel, Marburg) für die Durchführung der Fiebertests im Kaninchen. Bei Herrn Prof. Dr. J. Westermann (Medizinische Hochschule Hannover) bedanke ich mich für die Hilfe bei den ersten Versuchen zur Endotoxintoleranz.

Mein Dank schließt weiterhin alle ein, die mich in irgendeiner Form, sei es durch Korrekturlesen oder durch die Hilfe bei PC-Problemen, unterstützt haben.

Bedanken möchte ich mich ganz besonders noch bei meiner Mutter, meiner Schwester und meinem Lebensgefährten, Jens Reimers, für die liebevolle und aufmunternde Unterstützung, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit sehr hilfreich war.

INHALT

Abkürzungen

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | Problemstellung und Zielsetzung | 1 |
| 1.2 | Mykoplasmen | 2 |
| 1.2.1 | <i>Mycoplasma fermentans</i> | 3 |
| 1.2.2 | MALP-2, das Makrophagen stimulierende Lipopeptid aus <i>M. fermentans</i> | 4 |
| 1.3 | Die Interaktion von Mykoplasmen und Phagozyten | 6 |
| 1.3.1 | Die Phagozytose und Eliminierung von Mikroorganismen | 7 |
| 1.4 | Makrophagen als Bestandteil des Immunsystems | 8 |
| 1.4.1 | Makrophagenaktivierung | 9 |
| 1.4.2 | Zytokine | 9 |
| 1.4.3 | Chemokine | 11 |
| 1.5 | Leukozytendiapedese | 12 |
| 1.6 | Endotoxinschock und -toleranz | 14 |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN | 16 |
| 2.1 | Material | 16 |
| 2.1.1 | Chemikalien | 16 |
| 2.1.2 | Antikörper und Antiseren | 17 |
| 2.1.3 | Verbrauchsmaterial | 17 |
| 2.1.4 | Geräte | 18 |
| 2.1.5 | Mäuse | 19 |
| 2.1.6 | Mykoplasmen | 19 |
| 2.1.7 | Makrophagenaktivatoren | 19 |
| 2.1.7.1 | Mykoplasmale Lipopeptide | 19 |
| 2.1.7.2 | Lipopolysaccharid | 20 |
| 2.2 | Methoden | 20 |
| 2.2.1 | Kulturmedien und Lösungen für die Anzucht von Mykoplasmen | 20 |
| 2.2.2 | Kultivierung von Mykoplasmen | 22 |
| 2.2.2.1 | Radioaktive Markierung von Mykoplasmen | 23 |
| 2.2.2.2 | Mikroskopische Kontrolle des Mykoplasmenwachstums | 23 |
| 2.2.2.3 | MTT-Test | 23 |
| 2.2.2.4 | Proteinbestimmung | 24 |
| 2.2.2.5 | Bestimmung des Lipidgehalts einer Mykoplasmasuspension | 25 |
| 2.2.3 | Liposomen | 25 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.2.3.1 | Lipide..... | 25 |
| 2.2.3.2 | Herstellung von Liposomen | 26 |
| 2.2.3.3 | Liposomenzusammensetzung..... | 27 |
| 2.2.3.4 | Mikroskopische Beurteilung der Liposomen | 27 |
| 2.2.3.5 | Phosphatbestimmung | 28 |
| 2.2.4 | Zellkulturen | 29 |
| 2.2.4.1 | Kultivierung der Zelllinie C5F6..... | 29 |
| 2.2.4.2 | Bestimmung der Zellzahl | 31 |
| 2.2.4.3 | Einfrieren von C5F6-Zellen..... | 31 |
| 2.2.4.4 | Primäre Zellkulturen | 32 |
| 2.2.5 | Bestimmung der NO-Freisetzung | 33 |
| 2.2.6 | Pyrogenitätstest | 34 |
| 2.2.7 | Bestimmung der Phagozytose von Liposomen und Mykoplasmen | 34 |
| 2.2.8 | <i>In vitro</i> Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen..... | 35 |
| 2.2.9 | Intraperitoneale Injektion verschiedener Agenzien..... | 35 |
| 2.2.10 | Die Differenzierung von Peritonealzellen..... | 36 |
| 2.2.10.1 | Histologische Differenzierung | 36 |
| 2.2.10.2 | Opsonisierung von <i>Staphylococcus aureus</i> | 37 |
| 2.2.10.3 | FACS-Analyse..... | 37 |
| 2.2.11 | Induktion einer Endotoxintoleranz..... | 38 |
| 2.2.12 | TNF- α -Zytotoxizitätstest..... | 38 |
| 2.2.13 | IL-6-ELISA (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>) | 40 |
| 2.2.13.1 | Biotinylierung eines Antikörpers | 40 |
| 2.2.13.2 | Durchführung des IL-6-ELISAs..... | 41 |
| 2.2.14 | Bestimmung von MIP-1 α , MIP-2 und MCP-1 im ELISA..... | 42 |
| 2.2.15 | Statistik | 43 |
| 3 | ERGEBNISSE..... | 44 |
| 3.1 | Liposomen als Träger und Transportsystem des Makrophagen stimulierenden mykoplasmaalen Lipopeptids MALP-2 | 44 |
| 3.1.1 | Vorversuche mit Liposomen aus PC:PS:Cholesterol | 44 |
| 3.1.1.1 | Die Stimulation muriner Peritonealmakrophagen durch MALP-2-haltige Liposomen aus PC:PS:Cholesterol induzierte die Freisetzung von NO | 46 |
| 3.1.1.2 | Die Inkorporation von MALP-2 hatte auf die Phagozytose von Liposomen aus PC:PS:Cholesterol keinen Einfluß..... | 48 |
| 3.1.1.3 | Die iv-Injektion von MALP-2-haltigen Liposomen aus PC:PS:Cholesterol in Kaninchen induzierte keine signifikante Temperaturerhöhung | 50 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.1.2 | <i>In vitro</i> Vorversuche mit Liposomen unterschiedlicher Zusammensetzung | 50 |
| 3.1.2.1 | Die Konzentration des inkorporierten MALP-2 war abhängig von der Liposomenzusammensetzung | 53 |
| 3.1.2.2 | Die Inkorporation von Lactosylceramid oder <i>M. fermentans</i> -Lipid in Liposomen aus PG:PS:Cholesterol hatte keinen Einfluß auf die Phagozytose | 55 |
| 3.1.3 | Der Vergleich der <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Aktivität von Liposomen und Mykoplasmen | 57 |
| 3.1.3.1 | Die <i>in vitro</i> Aktivität von MALP-2-haltigen Liposomen entsprach der hitzegetöteter Mykoplasmen | 58 |
| 3.1.3.2 | Hitzegetötete Mykoplasmen wurden schneller phagozytiert als Liposomen..... | 60 |
| 3.1.3.3 | Die iv-Injektion hitzegetöteter Mykoplasmen sowie Liposomen-inkorporiertem und gelöstem MALP-2 induzierte im Kaninchen eine Erhöhung der Körpertemperatur..... | 61 |
| 3.2 | Das mykoplasmales Lipopeptid MALP-2 als potenter Stimulator der Zytokin- und Chemokinsynthese <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> | 62 |
| 3.2.1 | Vorversuche zum <i>in vivo</i> Verhalten von MALP-2..... | 63 |
| 3.2.1.1 | Die Auswahl eines geeigneten Mausstammes | 63 |
| 3.2.1.2 | Vorversuch zur Mykoplasmen-induzierten Granulozyteninfiltration..... | 64 |
| 3.2.1.3 | Vorversuch zur MALP-2-induzierten Granulozyteninfiltration | 66 |
| 3.2.2 | Die durch MALP-2 induzierte <i>in vitro</i> Synthese von Zytokinen und Chemokinen | 67 |
| 3.2.2.1 | Die <i>in vitro</i> Synthese der Chemokine MCP-1, MIP-1 α und MIP-2..... | 68 |
| 3.2.2.2 | Die <i>in vitro</i> Synthese von TNF- α und IL-6 | 70 |
| 3.2.2.3 | Die <i>in vitro</i> Kinetik der Chemokine MCP-1, MIP-1 α und MIP-2 | 71 |
| 3.2.3 | Die <i>in vivo</i> Aktivität des mykoplasmales Lipopeptids MALP-2 | 73 |
| 3.2.3.1 | Die durch Mykoplasmen induzierte Infiltration von Granulozyten war abhängig vom MALP-2-Gehalt in der Zytoplasmamembran..... | 73 |
| 3.2.3.2 | Die Kinetik der Leukozyteninfiltration nach ip-Injektion von hitzegetöteten <i>M. fermentans</i> sowie Liposomen-inkorporiertem und gelöstem MALP-2 | 75 |
| 3.2.3.3 | Drei Tage nach ip-Injektion hitzegetöteter Mykoplasmen, gelöstem MALP-2 und Liposomen-inkorporiertem MALP-2 dominierten Makrophagen und/oder Monozyten im murinen Peritonealraum | 78 |
| 3.2.4 | Die durch ip-Injektion von LPS induzierte Infiltration von Granulozyten | 82 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 3.2.5 | Die durch ip-Injektion verschiedener MALP-2-Präparationen induzierte <i>in vivo</i> Freisetzung chemotaktisch und inflammatorisch wirkender Mediatoren | 82 |
| 3.2.5.1 | Kinetik der <i>in vivo</i> Freisetzung von Chemokinen nach Injektion hitzegetöteter Mykoplasmen sowie gelöstem und Liposomen-inkorporiertem MALP-2 | 83 |
| 3.2.5.2 | Die Kinetik der <i>in vivo</i> Freisetzung von IL-6 nach Injektion hitzegetöteter Mykoplasmen sowie gelöstem und Liposomen-inkorporiertem MALP-2 | 88 |
| 3.2.5.3 | Die durch ip-Injektion von gelöstem MALP-2 induzierte Freisetzung von TNF- α | 90 |
| 3.2.6 | MALP-2 als Mediator der LPS-Toleranz ? | 91 |
| 4 | DISKUSSION | 94 |
| 4.1 | Die Inkorporation von MALP-2 in Liposomen | 95 |
| 4.2 | Die MALP-2-induzierte Infiltration von Leukozyten | 97 |
| 4.3 | Die MALP-2-induzierte Freisetzung von Chemokinen | 101 |
| 4.4 | Endotoxintoleranz | 105 |
| 4.5 | Ausblick | 108 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 110 |
| 6 | LITERATURVERZEICHNIS | 112 |

ABKÜRZUNGEN

| | |
|------------------------|---|
| A ₅₅₀ | Absorption bei 550 nm |
| BSA | <i>bovine serum albumin</i> |
| BSS | <i>balanced salt solution</i> |
| Cpm | <i>counts per minute</i> |
| ELISA | <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| FACS | <i>fluorescence-activated cell sorter</i> |
| FCS | Fötales Kälberserum |
| FITC | Fluorescein-Isothiocyanat |
| x g | Vielfaches der Erdbeschleunigung (Gravitationskonstante) |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| Ip | intraperitoneal |
| KD | Kilo-Dalton |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MALP-2 | <i>macrophage-activating lipopeptide of molecular mass 2 kDa</i> |
| MCP-1 | <i>monocyte chemoattractant protein-1</i> |
| MDHM | <i>Mycoplasma-derived high-molecular-weight material</i> |
| MIP-1 α | <i>macrophage inflammatory protein-1α</i> |
| MIP-2 | <i>macrophage inflammatory protein-2</i> |
| MSA | Makrophagen stimulierende Aktivität |
| NCS | <i>newborn calf serum</i> |
| NPD-PE | N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-Diazol-4-yl)-1,2- Dihexadecanoyl-sn-Glycero-Phosphoethanolamin, Triethylammoniumsalz |
| OD _(550 nm) | Optische Dichte bei 550 nm |
| OG | N-Octyl-beta-D-Glucopyranosid |

| | |
|---------------|---------------------------------------|
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> |
| PC | Phosphatidylcholin |
| PE | Phosphatidylethanolamin |
| PEC | <i>peritoneal exudate cells</i> |
| PG | Phosphatidylglycerol |
| PMN | <i>polymorphonuclear granulocytes</i> |
| PS | Phosphatidylserin |
| R | rekombinant |
| TNF- α | Tumor-Nekrose-Faktor- α |
| U | <i>unit</i> |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| v/v | <i>volume per volume</i> |
| w/v | <i>weight per volume</i> |

Abkürzungen für allgemein gültige Begriffe (siehe Duden), physikalische Größen und SI-Einheiten (*Systeme International D'Unites*) wurden in das Abkürzungsverzeichnis nicht aufgenommen.

1 EINLEITUNG

1.1 Problemstellung und Zielsetzung

Mykoplasmen sind zellwandlose, z. T. pathogene Bakterien, die sowohl im Tier als auch im Menschen eine Vielzahl von Krankheiten auslösen bzw. bereits bestehende negativ beeinflussen können. Die Infektion mit pathogenen Mykoplasmen vermag im Wirtsorganismus eine zelluläre Reaktion hervorzurufen, die u. a. durch die Infiltration von Leukozyten am Entzündungsort gekennzeichnet ist. Über die mykoplasmaalen Komponenten, die diese Leukozyteninfiltration auslösen, ist wenig bekannt. Lediglich in einer Membranprotein-Präparation aus *M. pulmonis* konnte bisher eine chemotaktische Wirkung gegenüber B-Lymphozyten *in vitro* nachgewiesen werden. Ziel dieser Arbeit war es, die *in vivo* Aktivität von MALP-2 (*macrophage-activating lipopeptide of molecular mass \geq kDa*), einem Makrophagen stimulierenden Lipopeptid aus *M. fermentans*, zu untersuchen. *In vitro* stimuliert MALP-2 murine Makrophagen u. a. zur Freisetzung von IL (Interleukin)-1, IL-6, TNF (Tumor Nekrose Faktor)- α und Stickstoffmonoxid (NO). Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, daß MALP-2 auch *in vivo* die Fähigkeit besitzt, Makrophagen zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (TNF- α und IL-6) zu stimulieren. Darüber hinaus konnte erstmalig nachgewiesen werden, daß MALP-2 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Freisetzung chemotaktisch wirkender Chemokine induziert und auf diesem Weg zur Infiltration von Leukozyten in das Gewebe (Leukozytendiapedese) und zu deren zielgerichteten Wanderung zum Entzündungsherd (Chemotaxis) beiträgt. Neben der Membranprotein-Präparation aus *M. pulmonis* stellt MALP-2 somit eine definierte, mykoplasmaale Komponente dar, die die bei einer Mykoplasmeninfektion zu beobachtende Infiltration von Leukozyten zu initiieren vermag. Ebenso wie MALP-2 verfügt auch Endotoxin, das Lipopolysaccharid (LPS) gram-negativer Bakterien, über die Fähigkeit, Makrophagen zur Freisetzung von Zyto- und Chemokinen zu stimulieren. Die Injektion hoher Endotoxindosen kann im Versuchstier das Vollbild eines septischen Schocks auslösen. Dieser beruht u. a. auf einer massiven systemischen Freisetzung von Entzündungsmediatoren, wie z. B. TNF- α . Durch die Injektion niedriger LPS-Dosen kann hingegen ein Status der Toleranz gegenüber letalen LPS-Dosen induziert werden, der durch eine reduzierte Zytokinfreisetzung gekennzeichnet ist. Dieses Phänomen wird auch als „Endotoxintoleranz“ bezeichnet. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine Endotoxintoleranz auch durch primäre Injektion des mykoplasmaalen Lipopeptids MALP-2 induziert werden kann. Hierbei konnte nachgewiesen werden, daß die Applikation von MALP-2 eine Reduktion der Endotoxin-induzierten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (TNF- α und IL-6) zur Folge hat. Diese reduzierte Zytokinfreisetzung kann als erster Beweis dafür angesehen werden, daß MALP-2 über die Fähigkeit zur Toleranzinduktion gegenüber LPS verfügt.

1.2 Mykoplasmen

Mykoplasmen sind die kleinsten zur Autoreduktion fähigen Prokaryonten. Ihr Genom entspricht mit ca. 600 bis 1400 Kilobasen [133] nur etwa einem Viertel des Genoms von *Escherichia coli* und zeichnet sich durch einen niedrigen Guanin-Cytosin-Gehalt (24 - 33 Mol%) aus [181]. Taxonomisch werden Mykoplasmen in der Klasse der Mollicutes (Weichhäuter) zusammengefaßt [144].

Klasse: Mollicutes

Ordnung I: Mycoplasmatales

Familie I: Mycoplasmataceae

Gattung I: Mycoplasma

Gattung II: Ureaplasma

Ordnung II: Entomoplasmatales

Familie I: Entomoplasmataceae

Gattung I: Entomoplasma

Gattung II: Mesoplasma

Familie II: Spiroplasmataceae

Gattung I: Spiroplasma

Ordnung III: Acholeplasmatales

Familie I: Acholeplasmataceae

Gattung I: Acholeplasma

Ordnung IV: Anaeroplasmatales

Familie I: Anaeroplasmataceae

Gattung I: Anaeroplasma

Gattung II: Asteroleplasma

Die cholesterinhaltige Zytoplasmamembran stellt die äußere Zellbegrenzung der Mykoplasmen dar, eine für Eubakterien typische Zellwand ist nicht vorhanden. Mykoplasmen sind aus diesem Grund unempfindlich gegen Antibiotika, die die Synthese des Mureingerüsts hemmen, wie z. B. β -Laktame. Das Fehlen der Zellwand bedingt auch die außerordentliche Pleomorphie der Mykoplasmen. In flüssigen Kulturen werden neben kokkoiden Formen mit einem Durchmesser von ca. 0,3 - 0,8 μm auch filamentöse, z. T. verzweigte Formen unterschiedlicher Länge ausgebildet. Auf festen Nährböden wachsen Mykoplasmen zumeist in Form charakteristischer „Spiegeleikolonien“. Die Vermehrung erfolgt, wie bei anderen sich autonom replizierenden Prokaryonten, durch Zweiteilung, der eine Replikation des Genoms vorausgeht. Zusätzlich treten auch sprossungsähnliche Vorgänge sowie ein Zerfall multinukleärer Filamente in kokko-ide Zellen auf.

Die Ansprüche von Mykoplasmen an ein Nährmedium sind sehr hoch, da ihre eigene Synthesefähigkeit aufgrund des kleinen Genoms stark begrenzt ist. So wurde z. B. die Anzahl der Gene,

die an der Synthese von Vitaminen, Fettsäuren und Nukleinsäurevorläufern beteiligt sind, im Lauf der Evolution stark reduziert [zusammengefaßt in 144]. Die Sequenzierung der Genome von *M. genitalium* und *M. pneumoniae* zeigte, daß diesen beiden Spezies die Fähigkeit zur Aminosäuresynthese sogar vollständig verloren gegangen ist [45, 67]. Bei der Kultivierung von Mykoplasmen muß der Bedarf an essentiellen Nährstoffen somit durch ein komplexes Nährmedium gedeckt werden.

Mykoplasmen leben obligat kommensalisch oder parasitär. Eine Vielzahl von Spezies wird als pathogen eingestuft. Bei Mensch und Tier besiedeln sie bevorzugt die Schleimhäute, u. a. des Respirations- und Urogenitaltraktes, sowie spezifisch auch Gewebe und Organe. Mit Ausnahme von *M. penetrans*, einer intrazellulär lebenden Spezies [103], gelten Mykoplasmen als Membranparasiten. Die intrazelluläre Lebensweise anderer Mykoplasmen-Spezies wird zur Zeit diskutiert.

Als eine Folge der Besiedlung von Schleimhäuten können Mykoplasmen u. a. Pneumonien und Urogenitalinfektionen hervorrufen [143]. Viele pathogene Mykoplasmen gelten im Tiermodell als Verursacher chronischer und akuter Arthritiden [24]. Beim Menschen sind sie als ursächliches Agens einer rheumatoiden Arthritis noch umstritten.

Mykoplasmen ist es aufgrund der fehlenden Zellwand möglich, in einen engen Kontakt mit der Wirtszelle zu treten. Dieser wird u. a. durch sogenannte Adhäsine aufrechtgehalten. Hierbei handelt es sich um z. T. Lipid-modifizierte Membranproteine [53, 65], die für die Pathogenität der Mykoplasmen eine wichtige Rolle spielen [102]. Auf dem engen Kontakt der Mykoplasmen zur Wirtszelle beruhen auch Zellschädigungen, die durch mykoplasmale Toxine, Enzyme und Stoffwechselprodukte, wie z. B. Ammoniak und Wasserstoffperoxid sowie durch den Entzug von Aminosäuren, Fettsäuren und Vitaminen, hervorgerufen werden [zusammengefaßt in 166].

Um der Immunantwort des Wirtes zu entgehen, bedient sich eine Vielzahl pathogener Mykoplasmen der Antigenvariation [zusammengefaßt in 144]. Hierbei handelt es sich um die Fähigkeit von Mikroorganismen, ihre Oberflächenantigene zu verändern und somit der humoralen Immunantwort des Wirtes auszuweichen. Ein weiterer Pathogenitätsmechanismus von Mikroorganismen, über den auch Mykoplasmen verfügen, ist die Kreuzreaktivität bzw. „molekulare Mimikry“ [57, 165, 193]. Bei einer Kreuzreaktion richtet sich die durch mikrobielle Epitope initiierte Immunantwort gegen den Wirt und löst eine Autoimmunantwort aus.

Zu den künstlichen Habitaten von Mykoplasmen zählen Zellkulturen, die im großen Umfang von ihnen infiziert werden können. Der Anteil der mit Mykoplasmen kontaminierten Zellkulturen wird auf 10 - 87 % geschätzt [144].

1.2.1 *Mycoplasma fermentans*

M. fermentans gehört zur Familie der Mycoplasmataceae. Diese Spezies wird, wie der Name bereits ausdrückt, den fermentativen Mykoplasmen zugeordnet, die über die Fähigkeit verfügen,

Glukose sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen abzubauen [122]. Im Stadium optimalen Wachstums bildet *M. fermentans* lange Filamente (siehe Abb. 1), die unter suboptimalen Kultivierungsbedingungen kugelige Formen annehmen.



Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *M. fermentans*. Vergrößerung: 10000fach.

Erstmals wurde *M. fermentans* 1953 aus dem Genitaltrakt zweier an einer Genitalinfektion erkrankten Patienten isoliert [153], konnte später aber auch im Urogenitaltrakt gesunder Personen nachgewiesen werden [111]. Direkte Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Entzündungen des Urogenitalbereiches und des Vorkommens von *M. fermentans* liegen bis heute nicht vor. Die Rolle, die *M. fermentans* bei einer Vielzahl anderer Erkrankungen spielt, ist ebenso umstritten. So gilt die Infektion mit dieser Spezies seit mehr als 20 Jahren als eine mögliche Ursache von Arthritis. Schaeffer et al. konnten mit Hilfe der PCR (*polymerase chain reaction*)-Technik bei 21 % an rheumatoider Arthritis erkrankten Patienten *M. fermentans* in den Gelenken nachweisen. In einem ähnlich hohen Prozentsatz gelang ein Nachweis dieser Spezies auch bei Patienten mit anderen Arthritiden, wie z. B. Spondylarthritis und Psoriasis-Arthropathie. In den Gelenken von Patienten mit juveniler oder reaktiver Arthritis konnte *M. fermentans* dagegen nicht detektiert werden [158].

In den letzten Jahren wurde *M. fermentans* auch mit AIDS (*acquired immune deficiency syndrome*) in Verbindung gebracht, einer durch das HI (*human immunodeficiency*)-Virus ausgelösten Immunschwäche. Sowohl im Blut [99] als auch im Urin [21] HIV-infizierter Patienten konnte diese Spezies nachgewiesen werden. *In vitro* wurde ein zytopathischer Effekt des HIV-1-Virus auf lymphoblastoide und promonozytische Zellen ausschließlich im Zusammenhang mit einer *M. fermentans*-Kontamination erzielt [99].

1.2.2 MALP-2, das Makrophagen stimulierende Lipopeptid aus *M. fermentans*

Anfang 1990 wurde aus dem Kulturüberstand einer mit *M. fermentans* infizierten myeloischen Zelllinie HL-60 eine Substanz isoliert, die die Fähigkeit besitzt, murine Makrophagen und humane Monozyten zur Freisetzung von IL-6 zu stimulieren [141]. Diese Substanz wurde zunächst als „MDHM“ bezeichnet, „*Mycoplasma-derived high-molecular-weight material*“. Als Reaktion auf eine Stimulation mit MDHM produzieren murine Makrophagen und humane Monozyten neben IL-6 auch IL-1, TNF- α und Prostaglandine [126] sowie im Fall IFN (Interferon)- γ -stimulierter muriner Makrophagen auch Stickstoffmonoxid [154]. Eine MDHM-induzierte Hemmung der spontanen und IFN- γ -abhängigen Expression von MHC (*major histocompatibility complex*)-Klasse II-Molekülen auf murinen Peritonealmakrophagen konnten Frisch et al. nachweisen [48]. Diese Hemmung resultiert in einer verminderten Antigenpräsentation gegenüber T-Zellen.

1997 konnte aus einem hochaktiven *M. fermentans*-Klon die Struktur eines Makrophagenaktivators isoliert und aufgeklärt werden [128]. Es handelt sich um ein membrangebundenes Lipopeptid, S-[2,3-bisacyl(C16:0/C18:0;C18:1)oxypropyl]cysteiny-GNNDENISFKEK, das sich vom Braun'schen Lipopeptid anderer Eubakterien durch den freien N-Terminus und dem daraus resultierenden Vorhandensein von nur zwei Fettsäuren unterscheidet (siehe Abb. 2). Inzwischen kann dieses, als „MALP-2“ bezeichnete Lipopeptid auch synthetisch hergestellt werden [128]. Der freie N-Terminus stellt die Grundlage der hohen Makrophagen stimulierenden Aktivität von MALP-2 dar, die Peptidsequenz der 14 Aminosäuren hat hingegen keinen Einfluß auf die Aktivität.

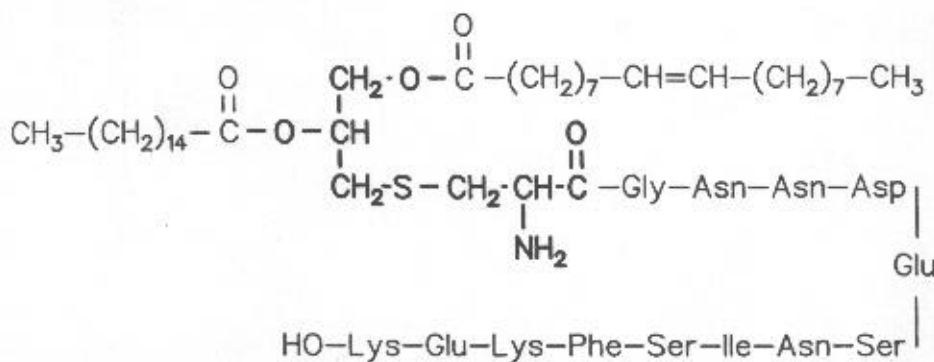


Abbildung 2: Die Struktur von MALP-2

Aus *M. hyorhinis*, einer in Schweinen arthritogen wirkenden Spezies [148], konnte ebenfalls ein membrangebundenes Lipopeptid mit freiem N-Terminus isoliert werden („MALP-H“), das über eine ähnlich hohe Makrophagen stimulierende Aktivität verfügt wie MALP-2 aus *M. fermentans* [129]. Die strukturelle Ähnlichkeit der beiden isolierten Lipopeptide läßt die Hypothese zu, daß es sich bei dem freien N-Terminus um ein allgemeines Charakteristikum mykoplasmales Lipopeptide bzw. -proteine handelt, welches sie von Lipoproteinen anderer Eubakterien unterscheidet. Unabhängig von der Peptidsequenz ist dieser freie N-Terminus für die hohe Makrophagen

stimulierende Aktivität verantwortlich: Die für eine halbmaximale Makrophagen stimulierende Aktivität benötigte Konzentration mykoplasmaer Lipopeptide liegt mit 1 pM MALP-2 bzw. 3 pM MALP-H tausendfach niedriger als die anderer bakterieller Lipopeptide [128, 129].

Das synthetisch hergestellte MALP-2 unterscheidet sich in zwei Punkten von dem nativen mykoplasmaalen Lipopeptid: synthetisches MALP-2 enthält zum einen keine ungesättigten Fettsäuren, zum anderen kann es in unterschiedlichen stereoisomeren Konfigurationen vorliegen. Diese werden entsprechend der gültigen Nomenklatur als (*R*)-MALP und (*S*)-MALP bezeichnet. Die Konfiguration hat einen gravierenden Einfluß auf die Makrophagen stimulierende Aktivität der Lipopeptide: Das dem natürlichen Lipopeptid entsprechende (*R*)-MALP-2 ist ca. dreihundertfach aktiver als (*S*)-MALP-2 [Mühlradt, unveröffentlicht].

MALP-2 wird von dem Gen *malp* kodiert. Ein weiteres Produkt dieses Gens ist MALP-404, ein 404 Aminosäuren umfassendes Lipoprotein der Zelloberfläche. Vermutet wird, daß MALP-2 durch posttranslationale proteolytische Spaltung aus MALP-404 hervorgeht. Unklar ist jedoch, ob diese Spaltung vor oder nach der Translokation von MALP-404 in die mykoplasmaale Zytoplasmamembran stattfindet [15].

1.3 Die Interaktion von Mykoplasmen und Phagozyten

Makrophagen sind die dominierenden phagozytischen Zellen gesunder Schleimhäute, wie z. B. des Respirations- und Urogenitaltraktes, und somit die ersten Phagozyten, die bei einer Mykoplasmen-Infektion mit dem Erreger in Kontakt treten. Als Reaktion auf eine Infektion mit pathogenen Mykoplasmen werden, wie im Rahmen dieser Arbeit erstmals gezeigt werden konnte, von den aktivierten Makrophagen sogenannte Chemokine (siehe 1.4.3) freigesetzt, die andere Leukozyten zum Entzündungsort locken. Wie bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen dokumentiert, handelt es sich bei diesen, im Verlauf einer Infektion angelockten Zellen, in erster Linie um neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten [28, 70, 101, 147, 180]. Eine Infiltration eosinophiler Granulozyten konnte nach Infektion boviner Milchdrüsen mit *M. bovis* nachgewiesen werden [51].

Die Interaktion von Phagozyten und Mykoplasmen in den frühen Stadien der Infektion, d. h. vor dem Auftreten spezifischer Antikörper, wird in der Literatur konträr diskutiert. Dies beruht u. a. darauf, daß sowohl die Mykoplasmen-Spezies als auch der phagozytierende Zelltyp eine solche Interaktion beeinflussen können. Zusätzlich treten auch Unterschiede im *in vitro* und *in vivo* Verhalten auf. *In vitro* kann eine Phagozytose und Eliminierung von Mykoplasmen ohne Opsonisierung durch spezifische Antikörper nicht bzw. nur in wenigen Fällen nachgewiesen werden [zusammengefaßt in 113]. Opsonine sind Plasmabestandteile, die durch Anlagerung an Antigene deren Elimination durch Phagozytose fördern. Bei den Plasmabestandteilen kann es sich u. a. um Antikörper (spezifische Opsonisierung) oder um Komplementfaktoren (unspezifische Opsonisierung) handeln. Die gebundenen Plasmabestandteile werden von den Phagozyten über spezifische

Oberflächenrezeptoren erkannt, z. B. über Fcγ-Rezeptoren, die an die Fc-Region der Antikörper binden [182] oder über Rezeptoren für Komplementkomponenten, u. a. CR1 (*complement receptor* 1) [43] und CR3 [88]. *In vivo*-Studien zur Interaktion von Phagozyten und Mykoplasmen beschränken sich in erster Linie auf *M. pulmonis*, dem Erreger der „*murine respiratory mycoplasmosis*“. Entgegen der früher vorherrschenden Meinung kann eine effiziente Eliminierung dieser Spezies aus der Lunge auch ohne spezifische Antikörper erfolgen [138]. Vermutet wird allerdings, daß unspezifische Opsonine, wie z. B. Komplementfaktoren oder das C-reaktive Protein, hierbei eine Rolle spielen. So wurden nach Infektion von Meerschweinchen mit *M. pneumoniae* lokal erhöhte Konzentrationen an Komplementkomponenten beobachtet [105]. Neben dem Vorhandensein spezifischer bzw. unspezifischer Opsonine ist die Phagozytose und Eliminierung *in vivo* vom Wirtsorganismus [18] und dessen genetischem Hintergrund [92], dem infizierenden Mykoplasmen-Stamm [71] sowie dem phagozytierenden Zelltyp [72] abhängig. Zusammenfassend kommt man in der Literatur zu der Schlußfolgerung, daß trotz einiger Beispiele für eine unspezifische Immunabwehr, Mykoplasmen in Abwesenheit spezifischer Antikörper gegenüber einer Phagozytose durch Makrophagen und Granulozyten relativ resistent sind. Erst mit der Synthese dieser Antikörper ca. fünf Tage nach einer Infektion und der Opsonisierung der Mykoplasmen kann eine schnelle und effektive Phagozytose und eine sich daran anschließende Eliminierung aus dem Wirtsorganismus erfolgen (siehe 1.3.1). An der Beseitigung der Mykoplasmen sind dann sowohl Makrophagen als auch polymorphkernige Granulozyten beteiligt. In der frühen Phase der Infektion, d. h. vor dem Auftreten spezifischer Antikörper, erstreckt sich die Aufgabe der Phagozyten daher vor allem auf die Antigenpräsentation sowie die Synthese verschiedener Mediatoren, wie Zyto- und Chemokine [25]. Diese wiederum tragen dazu bei, daß weitere Leukozyten aus dem Blut in das Gewebe gelangen (siehe 1.5) und zum Infektionsherd wandern (Chemotaxis). Auf diese Weise kann die Infektion bis zum Einsetzen der adaptiven Immunantwort unter Kontrolle gehalten werden.

1.3.1 Die Phagozytose und Eliminierung von Mikroorganismen

Makrophagen zeichnen sich, ebenso wie neutrophile Granulozyten, durch die Fähigkeit zur Phagozytose, der Aufnahme fester Partikel, aus. Diese Fähigkeit macht sie, neben dem alternativen Weg des Komplementsystems, zu einem Bestandteil der angeborenen, unspezifischen Immunabwehr gegen eine mikrobielle Invasion.

Im Anschluß an eine Bindung von Mikroorganismen an Makrophagen oder Granulozyten erfolgt deren Phagozytose. Der Erreger wird hierbei von dem Phagozyten durch amöboides Umfließen und Einstülpen der Zellwand eingeschlossen und gelangt im sogenannten Phagosom in das Innere der phagozytierenden Zelle. Nach dem Verschmelzen mit Lysosomen entsteht ein Phagolysosom, in dessen Lumen durch enzymatische Verdauung, u. a. durch Lysozym und saure Hydrolasen, das Bakterium zerstört wird [93]. Der Inhalt der Lysosomen läßt gleichzeitig den ursprünglich

neutralen pH-Wert des Phagosoms auf Werte zwischen 3,5 und 4 absinken und verleiht ihm somit eine bakteriostatische bzw. bakterizide Wirkung. Eine Schädigung der Bakterien erfolgt zusätzlich durch andere, von dem aktivierten Makrophagen synthetisierte, toxische Produkte. Dazu gehören Sauerstoffderivate, wie z. B. Superoxidanion (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxylradikal (OH^\cdot) [163], aber auch das von murinen, IFN- γ -kostimulierten Makrophagen synthetisierte Stickstoffmonoxid (NO). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Fähigkeit muriner Makrophagen zur NO-Synthese als Nachweis der Makrophagen stimulierenden Wirkung von MALP-2 genutzt. Nicht alle Mikroorganismen können von Makrophagen phagozytiert und im Anschluß daran sogleich abgetötet werden. Verschiedene Mikroorganismen, darunter Mykobakterien, *Leishmania* oder Listerien, entgehen trotz erfolgter Phagozytose einer Abtötung, indem sie eine Verschmelzung von Phagosom und Lysosomen verhindern oder in das Zytoplasma der Wirtszelle entkommen. Die Abtötung dieser Erreger erfordert ein externes, durch T_H1 -Zellen geliefertes Signal [170].

1.4 Makrophagen als Bestandteil des Immunsystems

Makrophagen sind große (\varnothing ca. 15 - 50 μm), mononukleäre Phagozyten, die ebenso wie die zur Phagozytose befähigten polymorphkernigen Granulozyten aus der myeloischen Stammzelle im Knochenmark entstehen. Hier entwickeln sie sich zu Monozyten, die das Knochenmark verlassen und in die Blutbahn eintreten. Durch die Wände der Kapillaren wandern die Monozyten in verschiedene Gewebe ein und differenzieren dort zu ortsständigen, „residenten“ Makrophagen. Diese verbleiben mehrere Monate im Gewebe und sterben dann ab. Bei der Differenzierung der Makrophagen in den verschiedenen Geweben kommt es zu morphologischen und funktionellen Veränderungen. Auf der daraus resultierenden Heterogenität beruht die Nomenklatur der Makrophagen (siehe Tabelle 1).

| Gewebe, Organ | Bezeichnung |
|-------------------|-----------------------------------|
| Bindegewebe | Hisiozyten |
| Leber | Kupffer-Sternzellen |
| Lunge | Alveolarmakrophagen |
| Knochen | Osteoklasten |
| Nervensystem | Mikrogliazellen |
| Lymphknoten, Milz | freie und sessile Makrophagen |
| Seröse Höhlen | Pleura- und Peritonealmakrophagen |

Tabelle 1: Übersicht der gewebetypischen Makrophagen

Makrophagen spielen in allen Phasen der Immunantwort eine zentrale Rolle. Zu ihren Hauptaufgaben gehören neben der Antigenprozessierung und -präsentation, auf die hier nicht weiter eingegangen wird, die Phagozytose und Eliminierung von Mikroorganismen (siehe 1.3.1) sowie die Synthese von Zyto- und Chemokinen (siehe 1.4.2 und 1.4.3).

1.4.1 Makrophagenaktivierung

Das Eindringen von pathogenen Mikroorganismen in das Gewebe induziert, wie unter 1.5 beschrieben, eine Leukozytendiapedese. Aus der Blutbahn in das Gewebe einwandernde Monozyten differenzieren dabei zu Makrophagen und werden, ebenso wie die bereits im Gewebe vorhandenen und ausdifferenzierten Makrophagen, aktiviert. Die Signale, die eine Aktivierung auszulösen vermögen, sind vielschichtig: Es kann sich um Zytokine (z. B. IFN- γ , TNF- α) handeln oder um Bestandteile der bakteriellen Zellwand, wie z. B. LPS [13, 124], Lipoteichonsäure [84], Peptidoglykanfragmente [8, 172] bzw. Lipoproteine [69], aber auch um zellwandlose Mykoplasmen und deren Bestandteile [49, 89, 104, 164, 198], darunter MALP-2 [127]. Diese Signale bewirken, daß in den Monozyten die Transkription von Genen aktiviert wird, die den entstehenden Makrophagen mit besonderen Fähigkeiten und Funktionen ausstatten. Dazu gehört u. a. eine erhöhte Phagozytose-Aktivität und eine Steigerung der Fähigkeit zur intrazellulären Abtötung von Mikroorganismen (siehe 1.3.1), die verstärkte Expression von MHC-Klasse II-Molekülen sowie eine gesteigerte Freisetzung von Entzündungsmediatoren, z. B. von Zytokinen und Chemokinen, auf die nachfolgend noch näher eingegangen wird (siehe 1.4.2 und 1.4.3).

1.4.2 Zytokine

Zytokine bilden eine Gruppe von heterogenen, z. T. glykosylierten Proteinen mit einer molekularen Masse von ca. 10 - 30 kDa. Die meisten Zytokine werden als Reaktion auf eine Aktivierung, u. a. durch bakterielle oder virale Bestandteile, synthetisiert. Sie werden von der aktivierten Zelle in gelöster Form in das umgebende Medium abgegeben oder bleiben als Membranproteine in der Zellwand verankert. Ein einzelnes Zytokin kann durch eine Vielzahl von Zellen synthetisiert werden, darunter Monozyten und Makrophagen, Lymphozyten, Granulozyten und Endothelzellen, und kann eine Vielzahl von Zelltypen beeinflussen (Pleotropismus). Zytokine binden mit hoher Affinität an spezifische Rezeptoren, die von ihren Zielzellen exprimiert werden. Dies hat zur Folge, daß bereits geringe Zytokinkonzentrationen in der Lage sind, einen biologischen Effekt hervorzurufen. Die durch AU-reiche Sequenzen in der 3'-Nichtkodierungsregion sehr instabile mRNA der Zytokine garantiert hingegen, daß die Synthese nur über einen kurzen Zeitraum erfolgt [zusammengefaßt in 1, 146]. Aufgrund ihrer Funktion werden Zytokine in drei Gruppen unterteilt: 1. Zytokine der natürlichen Immunabwehr und der Entzündungsreaktion (u. a. TNF- α , Interfero-

ne, IL-1 und IL-6), 2. Zytokine der Immunregulation (u. a. IL-2, IL-4, IL-10 und IFN- γ) und 3. Zytokine, die die Hämatopoese regulieren (u. a. IL-3, IL-11, GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)) [146]. Im folgenden wird auf drei Vertreter der ersten Gruppe eingegangen.

Zu den wichtigsten Zytokinen, die durch aktivierte Makrophagen freigesetzt werden und eine zentrale regulatorische Funktion bei der nichtadaptiven Immunabwehr haben, gehören TNF- α , IL-1 und IL-6. Alle drei sind sogenannte proinflammatorische, d. h. entzündungsfördernde Zytokine. Aufgrund ihrer fieberinduzierenden Wirkung werden sie auch als „endogene Pyrogene“ bezeichnet [33].

TNF- α (Kachektin) ist ein 17 kDa Protein [81], dessen Synthese durch LPS und andere mikrobielle Bestandteile sowie u. a. auch durch IL-1, IL-2, GM-CSF oder PAF (*platelet activating factor*) induziert werden kann [zusammengefaßt in 74]. Auch das mykoplasmale Lipopeptid MALP-2 ist in der Lage, Makrophagen zur Freisetzung von TNF- α zu stimulieren [127]. TNF- α ist ein Zytokin mit pleotroper Wirkung. Zu den wichtigsten physiologischen Funktionen gehört das Auslösen einer lokalen Entzündungsreaktion, die durch Schmerzen, Rötung, erhöhte Temperatur und Schwellung am Infektionsherd gekennzeichnet und auf Veränderungen in den lokalen Blutgefäßen zurückzuführen ist. Rötung und Erwärmung sind die Folgen eines vergrößerten Gefäßdurchmessers, Schwellung und Schmerz die von lokalen Flüssigkeitsansammlungen, bedingt durch eine erhöhte Permeabilität der Gefäße. Im Rahmen einer Entzündung aktiviert TNF- α außerdem die Blutgerinnung. Dies ist bei einer lokalen Infektion sinnvoll, da somit eine Ausbreitung der Infektion verhindert werden kann. Die durch die Blutgerinnung entstehende Druckerhöhung in den Gefäßen führt dabei gleichzeitig zu einem erhöhten Flüssigkeitseintritt ins Gewebe und zu einem verstärkten Lymphstrom zum regionalen Lymphknoten. Dort kann dann eine adaptive Immunreaktion ausgelöst werden. Das Wirkungsspektrum von TNF- α umfaßt weiterhin die verstärkte Eliminierung von Mikroorganismen durch Stimulation von Phagozyten zur Synthese toxischer Stoffwechselprodukte (z. B. O_2^- , H_2O_2 und NO) sowie die Stimulation von Makrophagen, Monozyten und Granulozyten zur Freisetzung von IL-1 [32] und IL-6 [14]. Die Bereitschaft von Granulozyten zur Adhärenz, eine wichtige Voraussetzung für die zielgerichtete Infiltration von Zellen am Ort der Infektion, wird durch die TNF- α -induzierte Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin und ICAM-1 auf Epithelzellen erhöht [50] (siehe auch 1.5).

Von IL-1 existieren zwei Formen: IL-1 α und IL-1 β . Diese werden von zwei verschiedenen Genen kodiert und sind sich, trotz geringer Aminosäurehomologie (26 %), in ihrer biologischen Wirkung sehr ähnlich. Die Synthese von IL-1 kann durch Zytokine (z. B. TNF- α oder IL-1 selbst), Komplementkomponenten oder durch LPS [34] bzw. andere mikrobielle Produkte, wie z. B. MALP-2 [126], induziert werden. IL-1 zeigt ein mit TNF- α vergleichbares Wirkungsprofil: Wie TNF- α induziert IL-1 die Synthese chemotaktischer Proteine [36], erhöht die Adhärenz zwischen Granulozyten und Endothelzellen [50] und fördert die Eliminierung von Mikroorganismen durch Stimulation der Synthese toxischer Stoffwechselprodukte.

IL-6, das ebenso wie IL-1 und TNF- α zur Gruppe der proinflammatorischen Zytokine gehört, wird als Reaktion auf eine Stimulation, z. B. durch LPS [117] oder MALP-2 [127] u. a. von Makrophagen und Monozyten synthetisiert. IL-6 ist neben IL-1 und TNF- α an der Auslösung der Immunantwort der akuten Phase beteiligt, die durch die Synthese von Serumproteinen in der Leber, den sogenannten „Proteinen der akuten Phase“ (*acute phase proteins*, APP) gekennzeichnet ist. Da IL-6 das breiteste Spektrum an APP induziert, stellt es den wichtigsten Mediator dieser Reaktion dar [2, 74]. Proteine der akuten Phase, darunter das C-reaktive Protein, können als unspezifische Opsonine (siehe 1.3) fungieren. Die Funktion anderer APP ist z. T. noch unbekannt.

Eine weitere wichtige Funktion von IL-6 besteht in der Stimulation der T-Lymphozyten-Proliferation sowie, bei Anwesenheit von IL-2, in deren Differenzierung zu zytotoxischen T-Zellen. Für B-Lymphozyten ist IL-6 ein Wachstumsfaktor bei der Differenzierung zu antikörperproduzierenden Plasmazellen [zusammengefaßt in 96]. Aufgrund dieser Eigenschaft wird IL-6 alternativ auch als BCDF (*B cell differentiation factor*) oder BSF2 (*B cell stimulating factor 2*) bezeichnet [68].

1.4.3 Chemokine

Im Verlauf der früh induzierten, nichtadaptiven Immunabwehr werden von den aktivierten Makrophagen sowohl Zytokine als auch Chemokine sezerniert. Chemokine sind per Definition proinflammatorische Zytokine, werden aber aufgrund der strukturellen Homologie untereinander und der Fähigkeit, eine zielgerichtete Bewegung von Leukozyten zu induzieren (siehe 1.5), in einer eigenen Familie zusammengefaßt. Neben Makrophagen sind eine Vielzahl anderer Zelltypen in der Lage, Chemokine zu synthetisieren. Dazu gehören Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten sowie Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen. Die Synthese der im nanomolaren Bereich wirksamen Chemokine [136] kann durch endogene Stimuli, wie z. B. IL-1 oder TNF- α , aber auch durch Viren, bakterielle Produkte und Bestandteile sowie Lektine induziert werden [zusammengefaßt in 55]. Wie sich im Rahmen dieser Arbeit gezeigt hat, ist auch MALP-2 in der Lage, Makrophagen zur Freisetzung von Chemokinen zu stimulieren.

Chemokine sind basische, Heparin-bindende Polypeptide mit einem Molekulargewicht von ca. 8 - 10 kDa und einer Aminosäuresequenzhomologie von 20 bis 50 %. Die Mitglieder dieser Familie verfügen über vier konservierte Cysteinreste, die zwei interne Disulfidbrücken bilden. Basierend auf der Position der beiden ersten Cysteinreste am N-terminalen Ende des Proteins sowie auf der chromosomalen Lokalisation der kodierenden Gene werden Chemokine in zwei Subfamilien unterteilt:

Bei den „ α -Chemokinen“ sind die ersten beiden Cysteinreste durch eine einzelne, beliebige Aminosäure voneinander getrennt. Sie werden daher auch als „C-X-C-Chemokine“ bezeichnet. Zu dieser Subfamilie gehören u. a. IL-8 (human), MGSA (*melanoma growth stimulatory activity*,

human), ENA-78 (human), PF-4 (*platelet factor 4*, human), IP-10 (*immune protein 10*, human), KC (murin) und MIP-2 (*macrophage inflammatory protein 2*, murin). Die meisten α -Chemokine verfügen außerdem über eine konservierte Abfolge von Aminosäuren am N-Terminus, dem ELR-Motiv, das aus den Aminosäuren Glutamin-Leucin-Arginin gebildet wird. Dieses Motiv spielt eine wichtige Rolle bei der Rezeptorbindung und der biologischen Aktivität [62]. Die zweite Subfamilie der Chemokine, die „ β -Chemokine“ oder „C-C-Chemokine“, zeichnen sich durch benachbarte Cysteinreste aus. Zu den Vertretern dieser Gruppe gehören u. a. RANTES (*regulated upon activation, normal T expressed, and presumably secreted*, human und murin), MIP-1 α und MIP-1 α (murin) bzw. LD-78 und Act-2 (human), JE/MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*, murin und human) und TCA-3 (*T cell activation 3*, murin) bzw. I-309 (human).

In der Vergangenheit wurde versucht, das Wirkungsspektrum von α - und β -Chemokinen deutlich voneinander abzugrenzen: α -Chemokinen wurde ein auf neutrophile Granulozyten, β -Chemokinen ein auf Monozyten und Makrophagen beschränktes chemotaktisches Potential zugeschrieben. Inzwischen mußte diese strikte Einteilung relativiert und erweitert werden:

Während einige β -Chemokine (z. B. MIP-1 α) in der Lage sind, die Migration von Neutrophilen zu induzieren [3], zeigen einige α -Chemokine (z. B. IP-10) chemotaktische Wirkung gegenüber Monozyten [176]. Die chemotaktische Aktivität der beiden Subfamilien beschränkt sich jedoch nicht nur auf Neutrophile, Monozyten und Makrophagen, sondern umfaßt auch Lymphozyten, basophile und eosinophile Granulozyten, NK-Zellen und Mastzellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die durch MALP-2 induzierte Freisetzung der murinen Chemokine MCP-1, MIP-1 α und MIP-2 und die auf diese Freisetzung zurückzuführende Infiltration von Leukozyten am Infektionsort untersucht.

1.5 Leukozytendiapedese

Eine Infektion mit pathogenen Mykoplasmen oder anderen Krankheitserregern führt im Wirtsorganismus zu einer gezielten Wanderung von Leukozyten durch das Gefäßendothel in das infizierte Gewebe. Die Wanderung durch das Gefäßendothel, die auch als Leukozytendiapedese bezeichnet wird, stellt einen komplexen Vorgang dar, der in vier Schritte unterteilt werden kann: „Rolling“, Aktivierung, Adhäsion und Auswanderung (siehe Abb. 3).

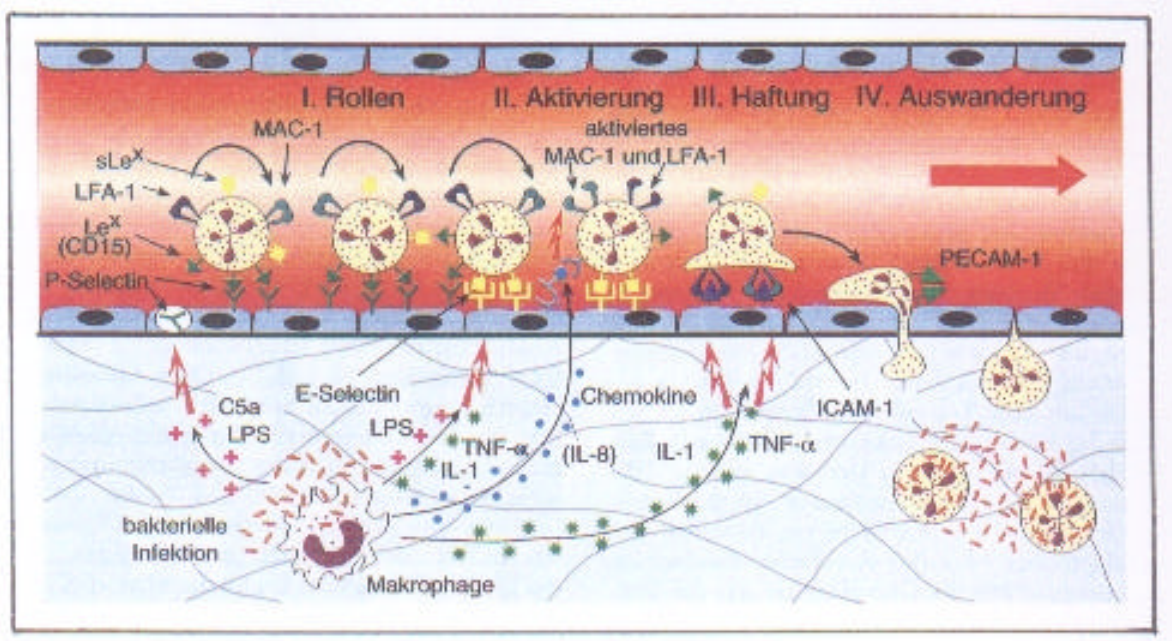


Abbildung 3: Leukozytendiapedese, nach Rieber [146], (Erklärungen im Text)

Der Gefäßaustritt der Leukozyten wird durch die Adhäsionsmoleküle P (*platelet*)- und E (*endothelial*)-Selektin eingeleitet, die infolge einer Stimulation (z. B. durch LPS, IL-1, TNF- α oder aktivierte Komplementkomponenten) auf der Oberfläche der Endothelzellen exprimiert werden (**I**). P-Selektin wird in den α -Granula der Blutplättchen [174] sowie in den Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen [118] konstitutiv synthetisiert und gespeichert. Durch Entzündungsmediatoren (z. B. Thrombin und Histamin) wird es innerhalb weniger Minuten mobilisiert und an die Oberfläche transportiert. Dort verbleibt das P-Selektin kurze Zeit und wird in weniger als 30 Minuten abgebaut [58]. E-Selektin hingegen wird erst mehrere Stunden nach Stimulation auf der Oberfläche aktivierter Endothelzellen exprimiert. Sowohl E- als auch P-Selektin sind aufgrund ihrer N-terminalen Lektin-Domäne in der Lage, selektiv an Glykoproteine zu binden, die sich auf der Oberfläche von Leukozyten befinden, wie z. B. das sialylierte Lewis X-Antigen (s-Le^x) [131], CLA (*cutaneous lymphocyte antigen*) [10] oder Le^x [94]. Die Wechselwirkung der Selektine mit ihren Liganden führt zu einer schwachen Bindung der Leukozyten an die Gefäßwand, dem sogenannten „Rolling“ [95], und resultiert in einer verminderten Fließgeschwindigkeit der Leukozyten im Blutstrom.

Der zweite Schritt der Diapedese (**II**) ist abhängig von Wechselwirkungen zwischen endothelialen Adhäsionsmolekülen (ICAMs, *intercellular adhesion molecules*), deren Expression z. B. durch Zytokine oder LPS induziert werden kann, und Leukozytenintegrinen. Monozyten, Neutrophile und NK-Zellen exprimieren jeweils die drei Leukozytenintegrine LFA (*lymphocyte function-associated antigen*)-1, MAC-1 und p150,95 auf ihrer Oberfläche, periphere Lymphozyten in erster Linie LFA-1 [6]. Die Integrine werden auf der Leukozytenoberfläche konstitutiv exprimiert und haben unter unstimulierten Bedingungen nur eine geringe Affinität zu ihren Liganden auf der Oberfläche der Endothelzellen. Infolge einer Aktivierung kommt es jedoch durch eine Konforma-

tionsänderung der Integrine sowie durch intrazelluläre Prozesse (z. B. Phosphorylierung) zu einer erhöhten Affinität dieser Moleküle gegenüber den endothelialen Adhäsionsmolekülen [52]. Induziert wird die „Aktivierung“ der Integrine in erster Linie durch Chemokine.

Die erhöhte Affinität zwischen Integrinen und Adhäsionsmolekülen und die daraus resultierende feste Bindung der Leukozyten an die Endothelzellen beendet das *Rolling* (III) und ermöglicht es den Leukozyten, sich am nächsten Interzellularspalt zwischen den Endothelzellen hindurch zu zwängen. Diese Durchquerung des Gefäßendothels kennzeichnet den vierten Schritt der Leukozytendiapedese (IV). Damit er erfolgen kann, müssen die Bindungen zwischen den Integrinen der Leukozyten und den endothelialen Adhäsionsmolekülen (Selektine sowie ICAMs) wieder gelöst werden. Die molekularen Interaktionen, die diesen Schritt veranlassen, sind noch nicht vollständig erforscht. Bekannt ist, daß das Adhäsionsmolekül PECAM (*platelet endothelial cellular adhesion molecule*)-1 beteiligt ist, ein Mitglied der Ig-Superfamilie, das konstitutiv sowohl auf Endothelzellen als auch auf Leukozyten exprimiert wird [130].

An den vierten Schritt der Diapedese schließt sich die Wanderung der Leukozyten durch das Gewebe zum Ort der Infektion an. Diese gezielte und als Chemotaxis bezeichnete Wanderung verläuft entlang eines Konzentrationsgradienten aus Chemokinen, die von den aktivierten Zellen am Infektionsherd sezerniert werden. Aufrecht gehalten wird der Gradient durch die Bindung der Chemokine an Heparin-haltige Proteoglykane im Gewebe sowie an extrazelluläre Matrixproteine, die über entsprechende Glukosaminoglykane verfügen [178].

Neben den klassischen Chemokinen sind eine Vielzahl anderer Faktoren in der Lage, eine Chemotaxis zu induzieren. Zu diesen gehören u. a. aktivierte Komplementkomponenten (z. B. C5a), PAF (*platelet activating factor*), Eikanoide (z. B. PG (*Prostaglandin*) E₂ oder LT (*Leukotrien*) B₄) sowie bakterielle Bestandteile (z. B. FMLP (*formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine*)).

1.6 Endotoxinschock und -toleranz

Als Endotoxinschock wird der speziell durch gram-negative Bakterien verursachte septische Schock bezeichnet. Er kann im Tiermodell durch die Applikation von aufgereinigtem Endotoxin simuliert werden und ist u. a. durch eine massive systemische Freisetzung von Entzündungsmediatoren, wie z. B. TNF- α [188], IFN- γ [189] und IL-1 [34] gekennzeichnet. Neben IFN- γ kommt besonders TNF- α eine zentrale Bedeutung zu: Im Tierversuch löst die Applikation von TNF- α einen durch Fieber, Verbrauchskoagulopathie (DIC, *disseminated intravascular coagulation*) und Organversagen gekennzeichneten septischen Schock aus und kann bei entsprechend hoher Dosierung letal wirken [132]. Verantwortlich dafür sind dieselben Mechanismen, die TNF- α bei einer lokalen Infektion dazu befähigen, diese unter Kontrolle zu halten (siehe 1.4.2). Die systemische Ausbreitung der Infektion und die damit verbundene systemische Freisetzung hoher TNF- α -Konzentrationen im Blut verursacht aufgrund der erhöhten Permeabilität der Gefäßwände einen Verlust von Blutplasma und eine gleichzeitige massive Blutgerinnung. Letztere kann über die

Bildung von Thrombosen und dem daraus resultierenden Mangel an Gerinnungsproteinen (DIC) zum Versagen lebenswichtiger Organe und somit zum Tod führen [zusammengefaßt in 78]. Mit poly- und monoklonalen Antikörpern gegen TNF- α [11, 79, 179] können Versuchstiere vor der letalen Wirkung hoher LPS-Dosen geschützt werden.

Ein Schutz vor der letalen Wirkung von LPS kann auch durch die Applikation monoklonaler Antikörper gegen IFN- γ induziert werden [12, 64, 91]. Dementsprechend führt die Applikation von murinem rIFN- γ vor bzw. bis zu vier Stunden nach einer LPS-Injektion zu einer erhöhten Mortalitätsrate bei Mäusen. Diese ist, bei Vorbehandlung der Versuchstiere mit murinem rIFN- γ , mit einem Anstieg der TNF- α -Konzentration im Serum verbunden. Eine Applikation von murinem rIFN- γ im Anschluß an eine LPS-Injektion hat im Gegensatz dazu keinen Effekt auf die TNF- α -Freisetzung [64]. IFN- γ ist somit, zumindest als Aktivator der TNF- α -Freisetzung, an der Entstehung eines Endotoxinschocks beteiligt. Andere IFN- γ -induzierte Mechanismen werden z. Zt. noch diskutiert.

Auch IL-1, das zusammen mit TNF- α zu den Hauptmediatoren einer Entzündung zählt, trägt zur Entstehung eines septischen Schocks bei. Obwohl die pathophysiologischen Wirkungen denen des TNF- α sehr ähnlich sind, kann IL-1 jedoch keine Gewebeerstörungen verursachen und zeigt auch in hohen Konzentrationen keine letale Wirkung [zusammengefaßt in 1]. Die klinischen Symptome eines Endotoxinschocks, u. a. Fieber und Hypotension, können hingegen auch durch IL-1 hervorgerufen werden [34].

Das Phänomen der „Endotoxintoleranz“ ist bereits seit mehr als hundert Jahren bekannt [19]. Es beschreibt ein durch Applikation subletaler Endotoxindosen refraktäres Stadium gegenüber Endotoxin. Unterschieden wird hierbei eine Toleranz der „frühen“ und eine Toleranz der „späten Phase“. Die Toleranz der frühen Phase beginnt bereits wenige Stunden nach der ersten Endotoxin-Injektion, ist vorübergehend und O-Antigen-unspezifisch, d. h. sie kann allein durch den „Lipid A-Anteil“ des Endotoxins induziert werden. Der ihr zugrunde liegende Mechanismus besteht in der als Reaktion auf die zweite Endotoxin-Stimulation nur noch eingeschränkt erfolgenden Synthese und Freisetzung von Entzündungsmediatoren durch Makrophagen des Retikulo-histiozytären Systems. Im Gegensatz zur frühen Phase beginnt die späte Phase der Endotoxin-Toleranz erst mehrere Tage nach der ersten Endotoxin-Injektion und ist gekoppelt an eine Synthese O-spezifischer Antikörper [zusammengefaßt in 80].

Eine Endotoxintoleranz kann nicht nur durch LPS selbst, sondern auch durch primäre Applikation von TNF- α und/oder IL-1 [27, 183] erzielt werden („Kreuztoleranz“). In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, daß auch MALP-2 über die Fähigkeit verfügt, ein refraktäres Stadium gegenüber Endotoxin zu induzieren.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

| | |
|--|---------------------|
| [1 α , 2 α (n)- ³ H]-Cholesterol, [³ H-Methyl]-Thymidin | Amersham Buchler |
| Lösungsmittel | Baker |
| NADPH (Na ₄ -Salz) | Biomol |
| Maus-rIL-6, Maus-rTNF- α , Nitratreduktase, Blocking-Reagenz, Trypsin | Boehringer Mannheim |
| Streptavidin-alkalische-Phosphatase | Dianova |
| Bacto Trypton | Difco |
| 2-Merkaptoethanol | Fluka |
| 0,9 %ige pyrogenfreie NaCl-Lösung, pyrogenfreies H ₂ O | Fresenius |
| RPMI 1640, DMEM, MEM alpha | Gibco |
| Wright-Färbelösung, Türck-Lösung, Diethanolamin, Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz | Merck |
| NBD-PE | Molecular Probes |
| Heparin | Ratiopharm GmbH |
| ELISA-Kits | R&D Systems |
| Eukitt | Riedel-de-Haën AG |
| Actinomycin, Thimerosal | Serva |
| Phospholipide, OG, FCS, NCS, Dimethylsulfoxid | Sigma |
| Szintillationsflüssigkeit | Zinsser Analytic |

Maus-rIFN- γ wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Adolf (Ernst Boehringer Institut für Arzneimittelforschung, Wien), Lactosylceramid von Herrn Dr. Kniep (Technische Universität Dresden) zur Verfügung gestellt.

Die weiteren, nicht gesondert aufgeführten Chemikalien, wurden von den Firmen Boehringer, Merck, Serva oder Sigma bezogen.

2.1.2 Antikörper und Antiseren

| | |
|---|------------------|
| Ratte-anti-Maus-Thy 1.2 (IgG _{2b}) | Becton Dickinson |
| Ratte-anti-Maus-CD19 (IgG _{2a} κ)/FITC, Maus-IgG | Dianova |
| Ratte-anti-Maus F4/80 (IgG _{2b}) | DKFZ Heidelberg |
| Ratte-anti-Maus-IL-6 (IgG ₁ κ) | Endogen |
| Ratte-anti-Maus-Gr1 (IgG _{2b})/FITC | ImmunoKontakt |
| Ziege-anti-Ratte IgG (H+L)/FITC | Medac |

Der monoklonale Antikörper „anti-Maus-IL-6“ vom Klon 6B4 wurde freundlicherweise von Herrn J. van Snick zur Verfügung gestellt.

2.1.3 Verbrauchsmaterial

| | |
|-------------------------------------|------------------|
| Einwegspritzen, Kanülen | Becton Dickinson |
| Einmalpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml) | Bibby |
| Zellkultur-Plastikmaterial | Corning |
| Sterilfilter | Gelman Sciences |
| Pipettenspitzen | Greiner |
| Dialyseschläuche | Loewe Biochemica |
| Sterilfilter | Nalgene |
| Maxisorb-Mikrotiterplatten | Nunc |
| Kanülen | Rose |

2.1.4 Geräte

| | |
|---|------------------------------|
| Ultraschallbad „Sonorex RK 100H“ | Bandelin |
| Spektralphotometer „DU 640“ | Beckmann |
| FACScan | Becton Dickinson |
| <i>Immunowasher</i> „1575“ | Biorad |
| Flüssigkeitsszintillationszähler „TRI-CARB 2100 TR“ | Canberra Packard |
| Wasserbad | CLF-Laborgeräte |
| Mikrotiterplatten-Schüttler „Wellmixx 4“ | Denley Instruments Ltd. |
| Mehrkanalpipetten | Dunn Labortechnik |
| Heizblock | Gebrüder Liebisch, Bielefeld |
| Pipetten | Gilson |
| Wipptisch „Polymax 1040“ | Heidolph |
| Sterilwerkbank, Brutschrank, Biofuge A, | Heraeus |
| <i>Immuno-Reader</i> „NJ 2000“ | InterMed |
| Lyophilisationsanlage | Leybold |
| Analysenwaage „AG 204“, Laborwaage „PE 3600“ | Mettler |
| Millipore-Q-Filtrationsanlage | Millipore |
| Zellzählkammer | Neubauer |
| Mikroskop „Diaphot 300“ | Nikon |
| Glasgefäße, pH-Meter „CG 840“ | Schott |
| Laborschüttler „Vortex-Genie 2“ | Scientific Industrie |
| Zytospin-Zentrifuge | Shandon Southern |
| ELISA-Reader „Spectra“ | SLT-Labinstruments |
| Zentrifuge „RCS“ | Sorvall |
| Autoklav | Webeco |
| Mikroskop „Universal“ | Zeiss |

2.1.5 Mäuse

Weibliche „LPS-low responder“ Inzuchtmäuse (C3H/HeJ) wurden von Bomholtgaard (Dänemark) bezogen, weibliche NMRI-Auszuchtmäuse von Harlan Winkelmann (Deutschland). Zum Zeitpunkt der Versuche lag das Alter der Tiere zwischen zwei und sechs Monaten.

2.1.6 Mykoplasmen

Für die Untersuchungen wurden folgende Mykoplasmen-Klone eingesetzt:

- *M. fermentans*, Klon 39
- *M. fermentans*, Klon II-29/1
- *M. fermentans*, Klon II-23

Klon II-29/1 und II-23 waren durch Klonierungen aus dem Mykoplasma-Stamm *M. fermentans* D15-86 hervorgegangen. Bei Klon 39 handelte es sich um einen Klon des Referenzstammes *M. fermentans* PG18.

2.1.7 Makrophagenaktivatoren

2.1.7.1 Mykoplasmale Lipopeptide

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden sowohl aus Mykoplasmen isolierte als auch synthetisch hergestellte Makrophagen aktivierende Lipopeptide verwendet. Bei den aus Mykoplasmen extrahierten und HPLC-gereinigten Lipopeptiden handelte es sich um MDHM, ein Lipoproteingemisch aus *M. fermentans* [127] sowie um MALP-H, ein Lipoproteingemisch aus *M. hyorhina* [129]. Beide lagen als Stammlösungen in einem Gemisch aus 2-Propanol, H₂O und N,N-Dimethylformamid (6:3,5:0,5) vor und konnten in dieser Form über mehrere Monate bei 4 °C aufbewahrt werden. Der Einsatz von MALP-H und MDHM beschränkte sich auf die Vorversuche, da zu diesem Zeitpunkt synthetisch hergestelltes Lipopeptid noch nicht zur Verfügung stand. Mit der Strukturaufklärung von MALP-2, einem Makrophagen stimulierenden Lipopeptid aus *M. fermentans*, wurde die Synthese größerer Mengen dieses Lipopeptids möglich [128]. Bei dem verwendeten MALP-2 handelte es sich, wie sich jedoch erst später herausstellte, um ein Gemisch aus zwei stereoisomeren Konfigurationen mit unterschiedlich hoher Makrophagen stimulierender Aktivität: um das gering aktive (S)-S-[2,3-bisacyl(C16:0/C18:0)oxypropyl] cysteinyl-GNNDESNISFKEK und das ca. 300fach aktivere (R)-S-[2,3-bisacyl(C16:0/C18:0) oxypropyl]cysteinyl-GNNDESNISFKEK [Mühlradt, unveröffentlicht]. (R,S)-MALP-2 wurde als Stammlösung in 2-Propanol/H₂O (1+1, v/v) bei 4 °C aufbewahrt. Die Aktivität der verwendeten Charge wurde im NO-Test bestimmt (siehe 2.2.5) und lag bei 9 pg/ml. Die Aktivität des im

Rahmen der Versuche zur Endotoxintoleranz verwendeten (*R*)-MALP-2 lag bei 2,3 pg/ml.

2.1.7.2 Lipopolysaccharid

LPS wurde aus einer S (smooth)-Form von *Salmonella typhimurium* durch Phenol/Wasser-Extraktion [192] gewonnen und lag als Stammlösung von 1 mg/ml aliquotiert bei -40 °C vor. Nach dem Auftauen konnte diese Stammlösung mehrere Monate bei 4 °C aufbewahrt werden.

2.2 Methoden

2.2.1 Kulturmedien und Lösungen für die Anzucht von Mykoplasmen

Die verschiedenen Medien und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit deionisiertem, in einer Milli-Q-Filtrationsanlage (Millipore) aufbereitetem Wasser hergestellt.

PBS (phosphate buffered saline):

| | |
|--|----------|
| NaCl | 137,0 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 1,5 mM |
| Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O | 8,1 mM |
| KCl | 2,7 mM |

Die Lösung wurde auf einen pH-Wert von 7-7,4 eingestellt, autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt.

GBF₃-Stammlösung:

MEM alpha Pulvermedium

| | |
|--------------------|-------------|
| NaHCO ₃ | 26,2 mM |
| Bacto Trypton | 0,5 % (w/v) |
| Fruktose | 5,0 mM |

Die GBF₃-Stammlösung wurde nach Einstellung eines pH-Werts von 7,1 sterilfiltriert (0,2 µm Hauptfilter mit 0,8 µm Vorfilter) und konnte für ca. zwei Monate bei 4 °C gelagert werden.

Newborn calf serum (NCS):

Zur Inaktivierung von Komplementfaktoren wurde das NCS eine Stunde bei 56 °C im Wasserbad erhitzt, sterilfiltriert (0,2 µm Hauptfilter mit 0,8 µm Vorfilter) und in gebrauchsfertigen Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

L-Glutamin-Stammlösung:

| | |
|------------|----------|
| L-Glutamin | 200,0 mM |
|------------|----------|

Die Stammlösung wurde sterilfiltriert (0,2 µm), aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Nukleinsäurevorläufer-Stammlösung:

| | |
|------------------|--------|
| Adenosin | 4,7 mM |
| Cytidin | 5,1 mM |
| Guanosin | 4,4 mM |
| Uridin | 5,1 mM |
| 2-deoxy-Adenosin | 5,0 mM |
| 2-deoxy-Cytidin | 4,7 mM |
| 2-deoxy-Guanosin | 4,7 mM |
| 2-deoxy-Thymidin | 5,2 mM |

Nach Einstellung eines pH-Werts von 5-6 wurde die Lösung ca. 30 min bei 40 °C im Ultraschallbad beschallt, sterilfiltriert (0,2 µm) und in Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

GBF₃-Gebrauchslösung:

| | |
|-----------------------------------|--------------|
| NCS | 10,0 % (v/v) |
| L-Glutamin | 2,0 mM |
| Nukleinsäurevorläufer-Stammlösung | 0,8 % (v/v) |
| in GBF ₃ -Stammlösung | |

Die GBF₃-Gebrauchslösung wurde frisch angesetzt.

Hayflick Medium:

| | | |
|-----------|-----------------------------|-------------|
| Lösung A: | <i>Heart infusion broth</i> | 2,7 % (w/v) |
| | Phenolrot | 40,8 µM |

Lösung A wurde mit 1 N NaOH auf einen pH-Wert von 7,8 eingestellt und 20 min bei 121 °C autoklaviert.

| | | |
|-----------|---------------------------------------|--------------|
| Lösung B: | Pferdeserum | 60,6 % (v/v) |
| | Frischhefeextrakt | 30,3 % (v/v) |
| | Nukleinsäurevorläufer- Stammlösung | 3,0 % (v/v) |
| | Glukose | 168,0 mM |

Zur Herstellung von Hayflick-Medium wurden Lösung A und Lösung B vereint. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4 °C.

Frischhefeextrakt:

25 g frische Bäckerhefe wurde in 100 ml H₂O gelöst, gut verrührt und 15 min gekocht. Nach einer 20minütigen Zentrifugation bei 12000 x g wurde der Überstand erst durch einen Faltenfilter filtriert und anschließend sterilfiltriert (0,2 µm Hauptfilter mit 0,8 µm Vorfilter). Gebrauchs fertige Aliquots wurden bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.2 Kultivierung von Mykoplasmen

Zur Kultivierung der Mykoplasmen wurde 1 ml einer bei -70 °C eingefrorenen Flüssigkultur aufgetaut und in 99 ml GBF₃-Gebrauchslösung überführt. Nach ca. 3 Tagen Inkubation bei 37 °C und 7,5 % CO₂ wurde die erhaltene Mykoplasmasuspension zur Gewinnung größerer Kulturmengen gesplittet (1:40 in GBF₃-Gebrauchslösung) und weiter kultiviert oder geerntet. Das Wachstum der Mykoplasmen wurde durch einen Farbumschlag des Inkubationsmediums von orange-rot nach gelb angezeigt und konnte sowohl unter dem Lichtmikroskop (siehe 2.2.2.2) als auch mittels MTT-Test (siehe 2.2.2.3) kontrolliert werden. Die Ernte der Mykoplasmen erfolgte im Stadium optimalen Wachstums (siehe 2.2.2.2 und 2.2.2.3). Zu diesem Zweck wurden die Mykoplasmen 30 min bei 12000 x g abzentrifugiert (4 °C), dreimal mit 0,9 %iger, pyrogenfreier Kochsalzlösung gewaschen und schließlich in NaCl-Lösung (1/200 - 1/500stel des Ausgangsvolumens) aufgenommen und resuspendiert. Vor dem Aliquotieren wurden die Mykoplasmen 10 min bei 95 °C im Wasserbad hitzegetötet. Die Aufbewahrung der hitzegetöteten Mykoplasmen erfolgte bei -20 °C.

2.2.2.1 Radioaktive Markierung von Mykoplasmen

Ein Großteil der für ihr Wachstum essentiellen Substanzen nehmen Mykoplasmen aus dem Nährmedium bzw. aus ihrer natürlichen Umgebung auf. Dazu gehören Nukleinsäuren und deren Vorläufer, die sie nicht oder nur eingeschränkt selbst synthetisieren können. Dem Inkubationsmedium zugesetztes, radioaktiv-markiertes Thymidin wird somit bei der Replikation in die mykoplasmale DNA eingebaut.

Zur radioaktiven Markierung wurde einer zwei Tage inkubierten Mykoplasmenkultur 1 mCi [^3H -methyl]-Thymidin (spezifische Aktivität: 2 Ci/mmol) zugesetzt. Diese Kultur wurde für weitere 24 Stunden inkubiert und dann geerntet (siehe 2.2.2).

2.2.2.2 Mikroskopische Kontrolle des Mykoplasmenwachstums

1 ml der Mykoplasmenkultur wurde entnommen und 15 min bei 12000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Nach der Resuspension des Sediments in 25 µl PBS erfolgte die lichtmikroskopische Kontrolle der Mykoplasmen bei 800facher Vergrößerung. Im Stadium des optimalen Wachstums bildet *M. fermentans* lange Filamente (siehe Abb. 1). Unter suboptimalen Bedingungen, z. B. in einer überalterten Kultur, nehmen diese Filamente zunehmend eine runde, stärker lichtbrechende Form an.

2.2.2.3 MTT-Test

Eine Vielzahl von Mykoplasmen, darunter *M. fermentans*, sind in der Lage, Tetrazoliumsalze zu reduzieren. Diese Reduktion bewirkt die Bildung von blauen Formazankristallen und somit einen Farbumschlag des Inkubationsmediums von gelb nach blau. Die Intensität der blauen Farbe, die von der Konzentration der Formazankristalle abhängt, ist direkt proportional zur Konzentration lebender Mykoplasmen (*colony-forming units*). Unter suboptimalen Bedingungen nimmt die Konzentration dieser Kristalle ab [87].

MTT-Lösung:

MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-12,1 mM
diphenyltetrazolium Bromid]
in PBS (siehe 2.2.1)

1000 µl, 500 µl und 250 µl einer wachsenden Mykoplasmenkultur wurden abgenommen und 15 min bei 12000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Das Sediment wurde in jeweils 100 µl GBF₃-Gebrauchslösung resuspendiert und die erhaltene Suspension mit je 10 µl MTT-Lösung versetzt.

Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden bei 37 °C und 7,5 % CO₂ wurden die gebildeten Formazankristalle durch Zugabe von 120 µl 5 % (v/v) Ameisensäure in 2-Propanol gelöst und die Konzentration des gebildeten blauen Farbstoffs im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 577 nm gegen 656 nm gemessen. Als Referenz diente mykoplasmenfreie GBF₃-Gebrauchslösung, der genau wie den mykoplasmenhaltigen Ansätzen, MTT-Lösung und 5 % (v/v) Ameisensäure in 2-Propanol zugesetzt wurde.

2.2.2.4 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehalts einer Mykoplasmasuspension wurde nach der Methode von Lowry durchgeführt [106].

Lowry-Reagenz:

| | | |
|-----------|--|----------|
| Lösung A: | NaOH | 100,0 mM |
| | Na ₂ CO ₃ | 189,0 mM |
| | Natriumtartrat x 2 H ₂ O | 0,9 mM |
| Lösung B: | CuSO ₄ x 5 H ₂ O | 20,0 mM |

Lowry-Reagenz wurde aus 50 Teilen Lösung A und 1 Teil Lösung B frisch angesetzt.

Folin-Reagenz:

| | |
|--------------------------------|---------|
| Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz | 2 Teile |
| NaOH (1 N) | 1 Teil |

Vier bis acht Mikroliter der zu messenden Probe wurden mit H₂O auf ein Volumen von 40 µl aufgefüllt, mit je 4 µl NaOH (1 N) versetzt und 3 min im Wasserbad bei 100 °C gekocht. Nach dem Abkühlen und dem Zusatz von 200 µl Lowry-Reagenz pro Ansatz erfolgte eine 20minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die Proben wurden im Anschluß daran mit jeweils 20 µl Folin-Reagenz versetzt und sofort gemischt. Nach 45 min bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 690 nm gegen eine proteinfreie Referenz im Photometer gemessen.

Um die Proteinkonzentration einer Probe ermitteln zu können, wurde parallel zu jeder Bestimmung eine Eichgerade mit bekannten Proteinkonzentrationen erstellt (nicht gezeigt). Als Eichlösung diente eine BSA (*bovine serum albumin*)-Stammlösung (1mg/ml), die in einer 1:2-Verdünnungsreihe bis zu einer Endkonzentration von 31,25 µg/ml verdünnt wurde. Die einzelnen Verdünnungsstufen wurden wie die Testlösungen behandelt.

2.2.2.5 Bestimmung des Lipidgehalts einer Mykoplasmasuspension

Das Vorkommen mykoplasmaer Lipide ist im Wesentlichen auf die Zytoplasmamembran beschränkt. Phospholipide, Glykolipide und Sterole gehören hier zu den wichtigsten Vertretern. Die Konzentration dieser Lipide ist sowohl von der Mykoplasmen-Spezies als auch von der Wachstumsphase und dem Kultivierungsmedium abhängig. Unter optimalen Bedingungen machen Lipide exponentiell gewachsener Zellen 25 - 35 % des Trockengewichts der Membran aus [zusammengefaßt in 152].

Die Kultivierung und Ernte der zu untersuchenden Mykoplasmen erfolgte wie unter 2.2.2 beschrieben. Allerdings wurden die Mykoplasmen nicht in Kochsalzlösung, sondern in pyrogenfreiem Wasser gewaschen und resuspendiert. Auf diese Weise konnte eine Verfälschung der Ergebnisse durch Salze in der Waschlösung ausgeschlossen werden. Nach dem Hitzetöten wurde die Mykoplasmasuspension in einem tarierten Gefäß für eine Stunde bei -70 °C eingefroren und im Anschluß daran über Nacht lyophilisiert. Durch Wägen des Gefäßes bis zum konstanten Wert konnte das Trockengewicht der Mykoplasmen ermittelt werden. Zur Bestimmung des Lipidgehalts wurde die Trockensubstanz in Methanol/Chloroform (1+1, v/v) gelöst und 20 min bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand mit den gelösten Lipiden wurde durch einen mit Watte gestopften Trichter in ein tariertes Gefäß überführt und unter N₂-Begasung eingengt. Nach der Verdunstung des Lösungsmittels erfolgte eine erneute Lyophilisation über Nacht und eine sich daran anschließende Gewichtsbestimmung der getrockneten Lipide.

2.2.3 Liposomen

2.2.3.1 Lipide

Von den zur Liposomenherstellung benötigten Lipiden wurden Stammlösungen in organischen Lösungsmitteln hergestellt:

L- α -Phosphatidylcholin, Distearoyl (PC):

10 % (w/v) in CHCl₃

DL- α -Phosphatidyl-L-Serin, Dipalmitoyl (PS):

0,1 % (w/v) in Methanol/CHCl₃ (1+1, v/v)

L- α -Phosphatidyl-DL-Glycerol, Dipalmitoyl (PG):

0,1 % (w/v) in Methanol

L- α -Phosphatidyl-Ethanolamin, Dipalmitoyl (PE):

0,05 % (w/v) in CHCl₃

N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-Diazol-4-yl)-1,2- Dihexadecanoyl-sn-Glycero-Phosphoethanolamin, Triethylammoniumsalz (NBD-PE):

0,1 % (w/v) in CHCl_3

Cholesterol:

0,1 % (w/v) in CHCl_3

Lactosylceramid:

0,1 % (w/v) in Methanol/ CHCl_3 (1+1, v/v)

M. fermentans-Lipid:

0,1 % (w/v) in Methanol/ CHCl_3 (1+1, v/v)

Zur Abtrennung von Verunreinigungen wurden die Lösungen durch eine 0,2 μm -Membran (Nalgene) filtriert und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

2.2.3.2 Herstellung von Liposomen

Alle Liposomenchargen wurden mit der Methode der Detergenzentfernung hergestellt. Zu diesem Zweck wurden die Lipide zusammenpipettiert (siehe Tabelle 2) und das Lösungsmittel bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und ca. 50 mbar im Rotationsverdampfer fast vollständig entfernt. Zur Herstellung MALP-2-haltiger Liposomen wurde dem Lipidgemisch vor dessen Eintrocknung im Rotationsverdampfer MALP-2 zugesetzt. Die Herstellung radioaktiv markierter Liposomen erfolgte durch den Zusatz von metabolisch [^{14}C]-markierten Phospholipiden aus *M. fermentans* (hergestellt von Prof. P. F. Mühlradt) bzw. [^3H]-Cholesterol. Zur vollständigen Trocknung wurde der Ansatz über Nacht unter der Sterilbank offen stehengelassen. Der getrocknete Lipidfilm wurde anschließend in 0,05 M Tris-gepuffertem OG (pH 7) gelöst (30 min bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ im Wasserbad) und in einen Dialyseschlauch (Visking 20, Wandstärke 0,02 mm) überführt. Die Dialyse erfolgte bei Raumtemperatur gegen das 50fache Volumen an 0,1 M Tris-gepufferter, 0,9 %iger, pyrogenfreier Kochsalzlösung. Das Außendialysat wurde dreimal nach jeweils 24 Stunden gewechselt. Im Anschluß an die Dialyse wurden die Liposomen in ein Zentrifugenröhrchen überführt, 30 min bei $47800 \times g$ und $4\text{ }^\circ\text{C}$ abzentrifugiert und in 0,9 %iger, pyrogenfreier NaCl-Lösung resuspendiert. Auf diese Weise wurde freies, d. h. nicht in die Liposomenmembran inkorporiertes MALP-2 entfernt. Das Waschen der Liposomen wurde unter gleichen Bedingungen zweimal wiederholt. Im Anschluß an die dritte Zentrifugation wurde das Liposomensediment in 0,9 %iger, pyrogenfreier NaCl-Lösung resuspendiert. Die Liposomensuspension wurde anschließend aliquotiert und bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

Zur Vermeidung mikrobieller Kontaminationen wurden alle Verbrauchsmaterialien 4 Stunden bei $180\text{ }^\circ\text{C}$ sterilisiert bzw. über Nacht mit 0,1 N NaOH ausgewaschen. Der Dialyseschlauch wurde 30 min ausgekocht. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Rotationsverdampfer erfolgten alle

Versuchsschritte unter der Sterilbank. Die Sterilität der fertigen Liposomensuspension wurde durch Inkubation eines Aliquots in Hayflick-Medium (siehe 2.2.1) überprüft.

2.2.3.3 Liposomenzusammensetzung

Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die gewählten Zusammensetzungen hergestellter Liposomen:

| Zusammensetzung | Molverhältnis |
|--|----------------------------|
| PC : PS : Cholesterol : NBD-PE | 1:1:1:0,007 |
| PG : PC : Cholesterol : NBD-PE | 1,08:1:0,25:0,007 |
| PG : PS : Cholesterol : NBD-PE | 1,08:1:0,25:0,007 |
| PC : PS : NBD-PE | 7:3:0,007 |
| PG : PS : Cholesterol : Lactosylceramid : NBD-PE | 1,08:1:0,25:0,25:0,007 |
| PG : PS : Cholesterol:NBD-PE + 25 % <i>M. fermentans</i> -Lipid | 1,08:1:0,25:0,007 + 25% |

Tabelle 2: Liposomenzusammensetzung

2.2.3.4 Mikroskopische Beurteilung der Liposomen

Die Beurteilung der hergestellten Liposomen erfolgte mittels Fluoreszenz- und Transmissions-elektronenmikroskopie (TEM). Als Bewertungskriterien dienten Vesikelform und -größe sowie die Homogenität der Liposomensuspension. Bei der Herstellung wurde den Liposomen 0,005 µMol des fluoreszierenden Phospholipids NBD-PE zugesetzt. Auf diese Weise konnten die Liposomen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops bei 320facher Vergrößerung sichtbar gemacht werden. Mittels dieser fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung erfolgte eine erste Beurteilung der Liposomenhomogenität. Liposomenform und -größe konnten hingegen, ebenso wie die Lamellarität der Liposomen, nur mittels Negativkontrastierung und anschließender TEM ermittelt werden. Bei der Negativkontrastierung wird das zu untersuchende Objekt von einem Kontrastmittel äußerlich umhüllt, ohne in dieses einzudringen oder sich anzulagern. Das elektronentransparente Objekt erscheint daher als helle Struktur in einer dunklen, weniger elektronentransparenten Umgebung.

Je ein Tropfen (~ 50 µl) der Liposomensuspension, bidestilliertem H₂O und Kontrastierungsmittel (4 % (w/v) Uranylazetat) wurden nebeneinander auf ein in einer Petrischale ausgespanntes Stück

Parafilm gegeben. In den Suspensionstropfen wurde ein mit abflottierbarer Kohle bedampftes Glimmerstück (ca. 2 x 2 mm) langsam eingetaucht, so daß der größte Teil der Kohlefolie auf die Oberfläche des Tropfens abflottierte. Nach ca. 30 sek wurde die Kohle zusammen mit dem Glimmerplättchen von der Suspensionsoberfläche abgezogen und in gleicher Weise auf die Oberfläche des Wassertropfens gebracht, wo sie ca. 5 sek verblieb. Die Kohle wurde kurz auf Filterpapier abgetupft und auf dem Kontrastierungsmittel vollständig abflottiert. Dabei sank das Glimmerstückchen ab, der Kohlefilm wurde mit einem Neopren-Kupfer-Grid aufgenommen. Überschüssiges Kontrastierungsmittel wurde mittels Filterpapier abgesaugt. Das getrocknete Präparat konnte dann in einem Zeiss STEM910 Transmissionselektronenmikroskop (LEO; Oberkochen) betrachtet werden.

Negativkontrastierung und TEM wurden freundlicherweise von E. Müller und M. Rohde (GBF) durchgeführt.

2.2.3.5 Phosphatbestimmung

Die Lipidkonzentration einer Liposomensuspension wurde mit Hilfe einer Phosphatbestimmung [107] ermittelt. Da ein Mol der verwendeten Phospholipide jeweils ein Mol Phosphor enthielt, konnte aus dem gemessenen Phosphorgehalt direkt auf die Phospholipidkonzentration geschlossen werden. Die Konzentration des Liposomen-inkorporierten Cholesterol wurde prozentual hinzuaddiert. Daraus ergab sich die Lipidkonzentration der untersuchten Liposomensuspension.

Aufschlußreagenz:

| | |
|--------------------------------|--------------|
| H ₂ SO ₄ | 30,6 % (v/v) |
| HClO ₄ (70 %) | 6,7 % (v/v) |

Reagenz C:

| | | | |
|------------|------------------------------|-------|-------|
| Reagenz A: | 1 M Natriumazetat | 1 | Teil |
| | 2,5 % (w/v) Ammoniummolybdat | 1 | Teil |
| | H ₂ O | 7 | Teile |
| Reagenz B: | L-Ascorbinsäure | 568,0 | mM |

Reagenz C wurde aus 9 Teilen Reagenz A und 1 Teil Reagenz B frisch und eisgekühlt angesetzt.

Bis zu 100 µl der zu untersuchenden Suspension wurden in ein Glasröhrchen überführt und über Nacht im Exsikkator eingetrocknet. Der getrocknete Lipidfilm wurde in 100 µl Aufschlußreagenz

aufgenommen und unter dem Abzug eine Stunde bei 95 - 98 °C, danach zwei Stunden bei 175 °C im Heizblock erhitzt. Nach Zugabe von je 1 ml Reagenz C und einer 90minütigen Inkubation bei 38 °C im Wasserbad erfolgte die Messung der Extinktion bei 820 nm im Photometer. Als Referenz diente hierbei das Gemisch aus Aufschlußreagenz und Reagenz C, das in ein leeres Glasröhrchen pipettiert und wie die zu untersuchenden Proben behandelt wurde. Die Eichgerade wurde mit einer Standardlösung bekannter Phosphatkonzentrationen (1 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) erstellt (nicht gezeigt). Die Konzentration der einzelnen Verdünnungsstufen lag zwischen 5 und 40 nMol Phosphat.

Die für die Phosphatbestimmung benötigten Glasröhrchen wurden, um mögliche Phosphatrückstände aus Waschmitteln zu entfernen, vorab mit deionisiertem Wasser ausgekocht und gespült.

2.2.4 Zellkulturen

2.2.4.1 Kultivierung der Zelllinie C5F6

C5F6-Zellen sind adhärent wachsende, TNF- α -sensitive Mausfibroblasten, die durch Klonierung aus der Zelllinie L929 hervorgegangen sind. Die C5F6-Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. C. Galanos (Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg) zur Verfügung gestellt. Die Zellen lagen in 1 ml-Aliquots à 5×10^5 Zellen vor, die bei -196 °C über flüssigem Stickstoff aufbewahrt wurden.

Fetales Kälberserum (FCS):

Zur Inaktivierung von Komplementfaktoren wurde das FCS eine Stunde bei 56 °C im Wasserbad erhitzt, sterilfiltriert (0,2 μm Hauptfilter mit 0,8 μm Vorfilter) und in gebrauchsfertigen Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

L-Glutamin-Stammlösung (200 mM):

siehe 2.2.1

2-Merkaptoethanol-Stammlösung:

2-Merkaptoethanol 1,0 % (v/v)

in PBS (siehe 2.2.1)

Kulturmedium für C5F6-Zellen:

| | |
|-------------------|--------------|
| L-Glutamin | 2,0 mM |
| 2-Merkaptoethanol | 25,0 µM |
| FCS | 10,0 % (v/v) |
| in RPMI 1640 | |

Modifiziertes PBS:

| | |
|---------------------------|---------|
| KCl | 2,7 mM |
| D(+)-Glukose (Monohydrat) | 6,1 mM |
| Phenolrot | 28,2 µM |
| in PBS (siehe 2.2.1) | |

Die Lösung wurde durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert.

EDTA-Stammlösung:

| | |
|--|---------|
| Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat (Titrplex III) | 26,9 mM |
| in modifiziertem PBS | |

Die Stammlösung wurde mit NaOH (1 N) auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt und sterilfiltriert (0,2 µm).

EDTA-Gebrauchslösung:

Die EDTA-Gebrauchslösung wurde frisch aus 0,13 Teilen EDTA-Stammlösung, 0,32 Teilen Trypsin-Lösung (2,5 %) und 9,55 Teilen modifiziertem PBS angesetzt.

Die gefrorene 1 ml-Kultur aus C5F6-Zellen (5×10^5 Zellen/ml) wurde bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach langsamer Zugabe von 10 ml Kulturmedium wurden die Zellen 10 min bei 250 x g (4 °C) abzentrifugiert, in insgesamt 25 ml frischem Kulturmedium aufgenommen und in einer 250 ml-Zellkulturflasche bei 37 °C und 7,5 % CO₂ kultiviert. Nach vier Tagen war der Gefäßboden dicht bewachsen. Das Kulturmedium wurde daraufhin abgegossen, Mediumrückstände mit warmen PBS entfernt und die Zellen durch eine 3minütige Inkubation (37 °C, 7,5 % CO₂) mit 6 ml eiskalter EDTA-Gebrauchslösung vom Gefäßboden abgelöst. Das Ablösen der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Die gelösten Zellen wurden auf 6 ml FCS geschichtet, 10 min bei 250 x g abzentrifugiert und nach Resuspensi-

on in 1 - 2 ml frischem Kulturmedium ausgezählt. Nach Einstellung einer definierten Zelldichte konnten die Zellen dann, in Abhängigkeit vom Versuchsziel, weiterkultiviert, eingefroren (2.2.4.3) oder im TNF- α -Zytotoxizitätstest (2.2.12) eingesetzt werden.

2.2.4.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde nach Anfärbung der Zellen mit Trypanblaulösung oder Türk-Lösung in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Ausgezählt wurden 4 Großquadrate mit jeweils 16 Kleinquadraten (Tiefe 0,1 mm, Seitenlänge 0,25 mm). Die Zelldichte wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Zellen / ml} = \frac{\text{gezählte Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4}{\text{Anzahl ausgezählter Großquadrate}}$$

2.2.4.3 Einfrieren von C5F6-Zellen

Einfriermedium:

| | |
|-------------------------|--------------|
| RPMI 1640 | 63,0 % (v/v) |
| FCS | 17,0 % (v/v) |
| DMSO (Dimethylsulfoxid) | 20,0 % (v/v) |

Kultivierte C5F6-Zellen wurden nach Ablösung vom Gefäßboden 10 min bei 250 x g (4 °C) abzentrifugiert, nach der Resuspension in 1-2 ml Kulturmedium ausgezählt und mit Kulturmedium auf eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Durch eine 1:2-Verdünnung mit eisgekühltem Einfriermedium erfolgte die Einstellung einer Zellzahl von 5×10^5 Zellen/ml. Die Zellen wurden als 1 ml-Aliquots bei -70 °C eingefroren und bei -196 °C über flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.2.4.4 Primäre Zellkulturen

BSS (*Balanced salt solution*):

| | | |
|----------------|---|-----------|
| Stammlösung A: | Glukose | 55,5 mM |
| | KH ₂ PO ₄ | 4,4 mM |
| | Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O | 14,0 mM |
| | Phenolrot | 282,2 µM |
| Stammlösung B: | CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 12,7 mM |
| | KCl | 53,6 mM |
| | NaCl | 1369,0 mM |
| | MgCl ₂ x 6 H ₂ O | 9,8 mM |
| | MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 8,1 mM |
| | HEPES | 100,0 mM |

Beide Lösungen wurden sterilfiltriert (0,2 µm). BSS wurde aus 1 Teil Stammlösung A, 1 Teil Stammlösung B und 8 Teilen H₂O angesetzt und konnte mehrere Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden.

Kulturmedium:

| | |
|-------------------|-------------|
| L-Glutamin | 2,0 mM |
| 2-Merkaptoethanol | 25,0 µM |
| FCS | 5,0 % (v/v) |

in DMEM (*Dulbecco's modified eagle's medium*)

Als primäre Zellkulturen dienten Peritonealzellen (PEC) aus C3H/HeJ- bzw. NMRI-Mäusen. Zur Gewinnung dieser Zellen wurde den mit CO₂-Gas getöteten und kurz in 70 %igen (v/v) Ethanol getauchten Mäusen nach dem Entfernen des Bauchfells ca. 3 ml eiskaltes BSS, 1% FCS in den Bauchraum injiziert. Durch Massieren des Bauches wurde das BSS verteilt und die Peritonealzellen suspendiert. Diese wurden dann mit Hilfe einer Pasteurpipette abgesaugt. Nach zweimaligem Spülen des Bauchraumes mit jeweils ca. 2 ml frischem BSS, 1 % FCS wurde die erhaltene Zellsuspension 10 min bei 250 x g (4 °C) abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellsediment in frischem Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden ausgezählt, auf eine Konzentration

von 2×10^6 PEC/ml eingestellt und in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/Loch in eine mit BSS, 1% FCS vorgespülte 96-Loch-Flachbodenmikrotiterplatte eingesät. Die Zellausbeute schwankte sowohl bei C3H/HeJ- als auch bei NMRI-Mäusen zwischen ca. 3×10^6 und 1×10^7 Zellen pro Maus und war u. a. vom Alter der Tiere abhängig.

Primäre Zellkulturen von C3H/HeJ- bzw. NMRI-Mäusen dienten dem *in vitro* Nachweis einer Makrophagenstimulation durch mykoplasmale Lipopeptide bzw. LPS. Weiterhin wurden primäre Zellkulturen eingesetzt, um die Phagozytose von Liposomen und Mykoplasmen durch Peritonealmakrophagen zu untersuchen.

2.2.5 Bestimmung der NO-Freisetzung

Bei dem NO-Test handelt es sich um einen empfindlichen biologischen Test, mit dessen Hilfe die Makrophagen stimulierende Aktivität einer Substanz anhand des freigesetzten Stickstoffmonoxid (NO) schnell, kostengünstig und reproduzierbar ermittelt werden kann. NO ist ein Gas mit kurzer Halbwertszeit, welches zusammen mit L-Citrullin in einer durch das Enzym NO-Synthase katalysierten Reaktion aus L-Arginin entsteht. Es oxidiert unmittelbar nach der Synthese zu Nitrat und Nitrit [112]. Die Synthese der NO-Synthase in murinen Makrophagen kann u. a. durch IFN- γ und LPS induziert werden [197].

Kulturmedium:

siehe 2.2.4.4

Griess-Reagens:

| | | |
|----------------|-----------------------------------|----------|
| Stammlösung A: | Naphtylethylendiamin x 2 HCl | 3,9 mM |
| Stammlösung B: | Sulfanilamid | 58,1 mM |
| | in H ₃ PO ₄ | 510,2 mM |

Die beiden Stammlösungen wurden bei 4 °C aufbewahrt. Unmittelbar vor Gebrauch wurden jeweils 1 Teil Stammlösung A und 1 Teil Stammlösung B vermischt.

Der NO-Test wurde eingesetzt, um die Makrophagen stimulierende Aktivität einer Probe (u. a. MALP-2-Stammlösung, MALP-2-haltige Liposomen oder LPS) zu bestimmen. Die Proben wurden zu diesem Zweck in Kulturmedium oder OG vorverdünnt und in einer mit BSS, 1% FCS vorgespülten 96-Loch-Flachbodenmikrotiterplatte in einer 1:2-Verdünnungsreihe mit einem Volumen von 50 μ l/Loch austitriert. Der Verdünnungsreihe wurden frisch isolierte PEC von C3H/HeJ-Mäusen in einer Dichte von 1×10^5 Zellen und einem Volumen von 50 μ l pro Vertiefung zugesetzt. Diese wurden, wie unter 2.2.4.4 beschrieben, gewonnen und unmittelbar vor dem

Einsäen mit 60 U/ml murinem rIFN- γ versetzt. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 45 - 48 Stunden bei 37 °C und 7,5 % CO₂. Anschließend wurde das durch Oxidation von NO entstandene NO₃⁻ mittels eines Gemisches aus Nitratreduktase (Endkonzentration: 20 mU/Loch) und NADPH (Endkonzentration: 100 μ M/Loch) zu NO₂⁻ reduziert (10 min bei RT). Die Nitritkonzentration wurde durch Zugabe von 100 μ l/Loch Griess-Reagenz in einer Diazokopplungsreaktion bei 550 nm gegen 690 nm nach 10 min photometrisch bestimmt.

Mittels eines laborinternen Standards, einer stabilen Membranpräparation aus Mykoplasmen, konnte eine Unit Makrophagen stimulierende Aktivität als die Konzentration definiert werden, welche halbmaximale NO-Freisetzung induziert [127]. Als Eichkurve (nicht gezeigt) diente Natriumnitrit, das in einer 1:2-Verdünnungsreihe von 200 μ M bis 6,25 μ M austitriert wurde.

2.2.6 Pyrogenitätstest

Der Pyrogenitätstest im Kaninchen wurde durchgeführt, um die Makrophagen stimulierende Aktivität von MALP-2 *in vivo* zu überprüfen. Zu diesem Zweck wurde Dreiergruppen von Kaninchen, mit einem Körpergewicht zwischen 2,2 und 3,6 kg, MALP-2 sowohl in gelöster als auch in partikulärer Form (hitzegetötete Mykoplasmen bzw. MALP-2-haltige Liposomen) intravenös appliziert. Liposomen ohne MALP-2-Inkorporation sowie 5 % (v/v) 2-Propanol in physiologischer Kochsalzlösung dienten als die entsprechenden Kontrollen. Der Injektion ging jeweils eine 2,5stündige Adaption der Kaninchen an die Umgebung (spezielle Käfige, rektales Thermometer, etc.) voraus. Nach ip-Injektion der Agenzien wurde die Körpertemperatur der Kaninchen über einen Zeitraum von drei bzw. sechs Stunden rektal gemessen.

Die Versuche wurden freundlicherweise von Herrn Dr. H. Ronneberger (Hoechst Marion Roussel, Marburg) durchgeführt.

2.2.7 Bestimmung der Phagozytose von Liposomen und Mykoplasmen

PEC von C3H/HeJ- oder NMRI-Mäusen wurden, wie unter 2.2.4.4 beschrieben, gewonnen und in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/Loch in eine 96-Loch-Flachbodenmikrotiterplatte eingesät. Diese wurde über Nacht (ca. 15 Stunden) bei 37 °C und 7,5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nichtadhärente Zellen (Lymphozyten, Mastzellen, Granulozyten) wurden dann mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Schüttlers (Wellmixx 4) durch ein 10 sek andauerndes Schütteln auf Stufe 8 abgetrennt. Die verbliebenen Zellen wurden in 100 μ l warmen BSS, 1 % FCS pro Loch aufgenommen und, wie oben beschrieben, ein weiteres Mal geschüttelt. Durch diese Methode entstand eine Zellkultur, die sich zu über 95 % aus Makrophagen zusammensetzte [47]. Die Abtrennung der nichtadhärenten Zellen wurde mittels Lichtmikroskop kontrolliert. Nach dem letzten Waschschritt wurden die Peritonealmakrophagen in 100 μ l/Loch frischem Kulturmedium aufgenommen,

das die radioaktiv markierten Liposomen bzw. Mykoplasmen enthielt, und bei 37 °C und 7,5 % CO₂ weiterinkubiert. Je nach Versuchsansatz wurden die nichtphagozytierten Partikel zu verschiedenen Zeitpunkten durch zweimaliges Schütteln auf dem Wellmixx 4 abgewaschen (s. o.) und die adhärennten Peritonealmakrophagen durch Spülen der einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit 0,1 N NaOH lysiert. Die Radioaktivität der einzelnen NaOH-Lösungen wurde nach Zugabe von 4 ml Szintillationsflüssigkeit in einem Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt. Um hierbei eine ausreichend hohe Radioaktivität (in cpm, *counts per minute*) zu erhalten, wurden die NaOH-Lösungen von fünf Vertiefungen mit identischer Liposomen- bzw. Mykoplasmenkonzentration vereinigt.

Als Kontrollen fungierten Vertiefungen der Mikrotiterplatten ohne Zellen, jedoch mit entsprechender Konzentration an Liposomen bzw. Mykoplasmen. Auf diese Weise konnte die unspezifische Radioaktivität ermittelt werden, die auf die Adhärenz der Partikel an die Plastikoberfläche der Mikrotiterplatte zurückzuführen war. Diese Kontrollwerte wurden bei der Berechnung der prozentualen Aufnahme von Liposomen bzw. Mykoplasmen subtrahiert.

2.2.8 *In vitro* Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen

Die Bestimmung der *in vitro* Freisetzung von Zytokinen (IL-6, TNF- α) und Chemokinen (MIP-1 α , MIP-2, MCP-1) wurde mit Peritonealmakrophagen aus NMRI-Mäusen durchgeführt. Diese wurden, wie unter 2.2.4.4 beschrieben, gewonnen und von Lymphozyten, Granulozyten und Mastzellen getrennt (siehe 2.2.7). Im Anschluß an die Abtrennung der nichtadhärennten Zellen wurden 100 μ l/Loch des zu testenden Makrophagenaktivators zugesetzt. Bei dem Dosis-Wirkungs-Experiment handelte es sich um eine 1:2-Verdünnungsreihe von MALP-2 (800 pg/ml bis 0,8 pg/ml) bzw. LPS (10 ng/ml bis 10 pg/ml). Für die Bestimmung der TNF- α -Freisetzung wurde 3,5 Stunden nach Zugabe der Makrophagenaktivatoren ein Aliquot des Kulturüberstandes entnommen. Die Entnahme von Kulturüberstand für die Bestimmung der Chemokine erfolgte nach sechs, für die IL-6-Bestimmung nach acht Stunden. Bis zur Durchführung der Nachweistests wurden die Proben bei -20 °C aufbewahrt.

Für die *in vitro* Kinetik der Chemokinfreisetzung wurden die isolierten Peritonealmakrophagen mit MALP-2 in einer Konzentration von 200 pg/ml stimuliert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von MALP-2 wurde der Kulturüberstand entnommen und bis zum Nachweis der Chemokine im ELISA bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.9 Intraperitoneale Injektion verschiedener Agenzien

Die intraperitoneale (ip) Injektion von Mediatoren in Mäuse ist ein etabliertes System, um den Einfluß dieser Substanzen auf die Infiltration von Leukozyten zu untersuchen [5, 157]. Im

Rahmen dieser Arbeit wurde NMRI-Mäusen ein maximales Volumen von 400 µl des zu untersuchenden Agens injiziert. Hierbei handelte es sich um hitzegetötete Mykoplasmen, MALP-2-haltige Liposomen bzw. Kontroll-Liposomen, gelöstes MALP-2 oder LPS. Um zu überprüfen, ob bereits durch die Behandlungsmethode die intraperitoneale Zellzusammensetzung beeinflusst wird, wurde als Kontrolle pyrogenfreie, 0,9 %ige Kochsalzlösung appliziert. Zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion wurden die Mäuse mit CO₂-Gas getötet und die Peritonealzellen nach Injektion von 1,2 ml BSS, 1 % FCS, 10 U/ml Heparin abgesaugt. Nach Abzentrifugation der PEC (10 min bei 250 x g, 4 °C) wurde die „peritoneale Spülflüssigkeit“ der einzelnen Mäuse in ein Eppendorfgefäß überführt und bis zur Bestimmung der darin enthaltenen Zyto- und Chemokin-konzentrationen bei -20 °C aufbewahrt. Mittels Kardialpunktion wurde von jeder Maus zusätzlich das Blut gewonnen. Nach einer ca. 30minütigen Inkubation bei 4 °C wurden die Blutzellen 15 min bei 250 x g abzentrifugiert und das Serum abgenommen. Dieses wurde bis zur Durchführung der Zyto- und Chemokinbestimmungen bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.10 Die Differenzierung von Peritonealzellen

Die isolierten Peritonealzellen (siehe 2.2.9) wurden nach Bestimmung der Zellzahl histologisch oder mittels FACS (*fluorescence-activated cell sorter*)-Analyse differenziert.

2.2.10.1 Histologische Differenzierung

Eine histologische Differenzierung wurde immer dann angewandt, wenn die Konzentrationsbestimmung der Makrophagen und Monozyten im Vordergrund stand. Dieses war in erster Linie 72 Stunden nach einer intraperitonealen Injektion der Fall, da zu diesem Zeitpunkt die Konzentration infiltrierter Granulozyten wieder abgenommen hatte, die Gesamtleukozytenzahl hingegen noch deutlich erhöht war. Die Differenzierung mittels FACS-Analyse scheiterte an einem geeigneten Antikörper für Makrophagen und Monozyten, da die Expression des spezifischen Oberflächenantigens F4/80 durch eine Aktivierung der Zellen herabgesetzt wird [39]. Um speziell Lymphozyten und Makrophagen/Monozyten voneinander unterscheiden zu können, wurden die Peritonealzellen ($1,5 \times 10^6$ Zellen/ml in Kulturmedium) für 10 min bei 37 °C und 7,5 % CO₂ mit opsonisiertem *Staphylococcus aureus* (ca. 100 Bakterien/Zelle) (siehe 2.2.10.2) inkubiert. Nichtphagozytierte Bakterien wurden durch zweimaliges Waschen (5minütige Zentrifugation bei 250 x g und Resuspension der PEC in PBS, 2 % FCS) entfernt. Nach Einstellung einer Zellzahl von 1×10^5 Zellen/ml mit PBS, 10 % FCS wurden die PEC mittels einer Zytocentrifuge in einer Dichte von 2×10^4 Zellen auf Objektträger zentrifugiert (5 min bei 200 x g) und konnten nach Anfärbung mit Wright-Färbelösung mikroskopisch differenziert werden. Makrophagen und Monozyten konnten durch das Vorhandensein phagozytierter Bakterien identifiziert werden. Pro Zytopräparat wurden zwischen 300 und 400 Zellen ausgezählt.

2.2.10.2 Opsonisierung von *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus ist ein gram-positives, pathogenes Bakterium. Einige Stämme dieser Spezies verfügen über eine Polysaccharidkapsel, die eine direkte Aufnahme des Bakteriums durch Phagozyten verhindert. Eine Aufnahme und Eliminierung kann somit erst dann erfolgen, wenn das Bakterium von Antikörpern umhüllt ist, die von den Fcγ-Rezeptoren phagozytierender Zellen erkannt werden. Dieser Vorgang wird auch als Opsonisierung bezeichnet (siehe 1.3). Die Opsonisierung hitzegetöteter *Staphylococcus aureus* erfolgte durch 30minütige Inkubation der Bakteriensuspension mit Humanserum (A₁B, Rhesus negativ) bei 37 °C und 7,5 % CO₂. Im Anschluß an die Inkubation wurde das Serum durch zweimaliges Waschen der Bakteriensuspension (10 min bei 10000 x g, Resuspension des Sediments in PBS) entfernt. Eine Bestimmung der Bakterienzahl mittels Neubauer Zählkammer (siehe 2.2.4.2) erwies sich aufgrund Brown'scher Molekularbewegung als schwierig und konnte nur einen ungefähren Anhaltspunkt geben. Die opsonisierten Bakterien wurden bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.10.3 FACS-Analyse

Für die Differenzierung von Peritonealzellen mittels FACS-Analyse wurde die Zellzahl der individuellen Mäuse mit PBS, 2 % FCS, 0,02 % Natriumazid auf $7,5 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt. In Abhängigkeit von der Anzahl zu untersuchender Antikörper wurden pro Maus bis zu sechs Ansätze à $7,5 \times 10^5$ Zellen hergestellt (max. 4 verschiedene Antikörper, 2 Kontrollen). Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS, 2 % FCS, 0,02 % Natriumazid (5minütige Zentrifugation bei 250 x g, Resuspension des Zellsediments) wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Zelloberfläche durch eine 10minütige Inkubation mit 75 µl Maus-IgG (20 µg/100 µl) blockiert. Anschließend wurden die Zellen erneut zweimal gewaschen (s. o.) und für 30 min mit je 75 µl des primären Antikörpers inkubiert. Folgende primäre Antikörper wurden, verdünnt mit PBS, 3 % BSA, eingesetzt: Ratte-anti-Maus-Gr1 (1:10, FITC (Fluorescein-Isothiocyanat)-konjugiert), Ratte-anti-Maus-CD19 (1:50, FITC-konjugiert), Ratte-anti-Maus-Thy 1.2 (1:250) und Ratte-anti-Maus F4/80 (1:100). Nach dem Abwaschen ungebundener Antikörper (s. o.) folgte, sofern der primäre Antikörper nicht direkt FITC-gekoppelt war, die Detektion mit einem FITC-gekoppelten, 1:100 in PBS, 3 % BSA verdünnten Zweitantikörper (Ziege-anti-Ratte IgG, H+L). Dieser wurde den Zellen in einem Volumen von 75 µl zugesetzt und über einen Zeitraum von 30 min inkubiert. Im Anschluß an ein zweimaliges Waschen (s. o.) wurde mittels FACS-Analyse die von der Konzentration des gebundenen Antikörpers abhängige Fluoreszenz der Zellen bestimmt. Tote Zellen und Erythrozyten wurden bei der Analyse nicht berücksichtigt. Als Kontrollen dienten unmarkierte sowie ausschließlich mit dem sekundären Antikörper markierte Zellen. Während der gesamten Versuchsdurchführung wurden die Zellen und die verwendeten Lösungen auf Eis gekühlt.

Die FACS-Analyse wurde bei der Identifizierung von Granulozyten nach deren Markierung mit dem Granulozyten-spezifischen, monoklonalen Antikörper „anti-Gr1“ angewandt. Da die verschiedenen Granulozyten das entsprechende Antigen jedoch unterschiedlich stark exprimieren (siehe 3.2.1.2), wurde im Verlauf dieser Arbeit für die Quantifizierung von Granulozyten zunehmend die mikroskopische Auszählung favorisiert. Die FACS-Analyse war jedoch notwendig, um Auskunft über eine mögliche Infiltration von T-Zellen zu erhalten.

2.2.11 Induktion einer Endotoxintoleranz

Versuche zur Endotoxintoleranz wurden mit NMRI-Mäusen durchgeführt. Dreiergruppen von Mäusen wurde primär NaCl, MALP-2 bzw. LPS intraperitoneal injiziert. Die Sekundärinjektion mit LPS erfolgte anschließend nach 3, 24 und 72 Stunden. Nach einer weiteren Stunde wurden Serum und Peritonealflüssigkeit, wie unter 2.2.9 beschrieben, gewonnen und bis zur Bestimmung von TNF- α und IL-6 bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.12 TNF- α -Zytotoxizitätstest

Die TNF- α -Konzentration in den Überständen von Makrophagenkulturen sowie im Serum und in der Peritonealflüssigkeit behandelter Mäuse wurde in einem Zytotoxizitätstest mit C5F6-Zellen bestimmt. Der Bioassay beruht auf der toxischen Wirkung von TNF- α gegenüber den murinen Fibroblasten. Bestimmt wird die von der TNF- α -Konzentration im Kulturüberstand abhängige Anzahl lebender Zellen nach deren Anfärbung mit Kristallviolett.

Kulturmedium:

siehe 2.2.4.4

Actinomycin-Stammlösung:

Actinomycin 80,0 μ M

in PBS (siehe 2.2.1)

Die Actinomycin-Stammlösung wurde 15 min im Ultraschallbad beschallt und mit Hilfe eines Laborschüttler (Vortex) kräftig durchmischt.

Actinomycin-Gebrauchslösung:

| | |
|-------------------------|----------|
| Actinomycin-Stammlösung | 1 Teil |
| Kulturmedium | 24 Teile |

1 x HBSS (Hank's *balanced salt solution*):

| | | |
|-----------|---|----------|
| Lösung A: | NaCl | 136,9 mM |
| | KCl | 5,4 mM |
| | MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 811,0 µM |
| | Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O | 338,0 µM |
| | KH ₂ PO ₄ | 441,0 µM |
| | Glukose | 5,6 mM |
| Lösung B: | CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 1,3 mM |

Lösung A wurde in ca. 700 ml, Lösung B in ca. 100 ml H₂O gelöst. Beide Volumina wurden vereinigt und nach dem Einstellen eines pH-Werts von 7,4 auf 1 l aufgefüllt.

HBSS wurde als 10-fache Stammlösung angesetzt, sterilfiltriert (0,2 µm) und bei Raumtemperatur gelagert.

Kristallviolett-Färbelösung:

| | |
|--------------------------------------|--------------|
| Kristallviolett | 1,2 mM |
| neutralisiertes Formalin (37 %, v/v) | 12,0 % (v/v) |
| Ethanol (96 %, v/v) | 10,0 % (v/v) |
| in H ₂ O | |

Lösungs-Reagenz:

| | |
|---|--------|
| KH ₂ PO ₄ (0,1 M) | 1 Teil |
| Ethanol (96 %, v/v) | 1 Teil |

Für den Bioassay wurden C5F6-Zellen einer vier Tage bei 37 °C und 7,5 % CO₂ gewachsenen Kultur (siehe 2.2.4.1) in einem Volumen von 100 µl und einer Dichte von 5 x 10⁴ Zellen pro Loch in eine 96-Loch-Flachbodenmikrotiterplatte eingesät und drei Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde in jede Vertiefung 50 µl Actinomycin-Gebrauchslösung sowie 50 µl der zu untersuchenden Probe (gegebenenfalls in Kulturmedium verdünnt) gegeben. Nach einer

20stündigen Inkubation bei 37 °C und 7,5 % CO₂ im Brutschrank wurde der Kulturüberstand verworfen und die Zellen zweimal mit HBSS (1 x) gewaschen. Das Waschen der Zellen erfolgte durch Eintauchen der Mikrotiterplatte in die Waschlösung. Die Zellen wurden dann mit Kristallviolett-Färbelösung (50 µl/Loch) für 15 bis 20 min angefärbt, zweimal durch Tauchen in Leitungswasser gewaschen und durch die Zugabe von Lösungsreagenz (50 µl/Loch) und kräftigem Schütteln auf dem Wellmixx 4 vom Boden der Mikrotiterplatte gelöst. Die von der Anzahl lebender C5F6-Zellen abhängige Farbstoffkonzentration wurde im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 550 nm gegen 690 nm gemessen.

Die TNF- α -Konzentration der Proben wurde anhand einer Standardkurve (nicht gezeigt) ermittelt. Als Standard diente murines rTNF- α mit einer halbmaximalen Aktivität von 17 pg/ml (Boehringer Mannheim). Der Standard wurde in einer 1:2-Verdünnungsreihe von 320 pg/ml bis 0,16 pg/ml ausstitriert. Die Nachweisgrenze des Tests lag bei ca. 5 pg/ml.

2.2.13 IL-6-ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

Der IL-6-ELISA ist ein sogenannter „Sandwich-ELISA“. Charakteristisch für diesen ELISA-Typ ist die Fixierung eines spezifischen Antikörpers (Festphasenantikörper) an eine Matrix. Nach Zugabe von Proben (z. B. Serum oder Kulturüberstände stimulierter Makrophagen) mit dem spezifischen Antigen bilden sich Antikörper-Antigen-Komplexe aus. Das dort gebundene Antigen wird von einem zweiten spezifischen Antikörper erkannt. Dieser kann u. a. eine Fluoreszenz-Markierung tragen oder mit einem Enzym (z. B. alkalische Phosphatase) verknüpft sein, das in der Lage ist, ein farbloses Substrat in ein farbiges Produkt umzuwandeln. Die Farbreaktion läßt sich dann mit hoher Empfindlichkeit photometrisch nachweisen.

Im Fall des IL-6-ELISAs ist der zweite Antikörper biotinyliert und nicht direkt mit dem Enzym verknüpft. Dieses ist an Streptavidin gebunden, einem Protein, zu dem Biotin eine sehr hohe Affinität besitzt und das seinerseits in der Lage ist, bis zu vier Biotinmoleküle zu binden. Die Biotinylierung des Antikörpers führt zu einer deutlichen Steigerung der Empfindlichkeit des Testsystems [199].

2.2.13.1 Biotinylierung eines Antikörpers

Der IL-6-spezifische, monoklonale Antikörper vom Klon 6 B4 wurde freundlicherweise von J. van Snick zur Verfügung gestellt und als Detektionsantikörper im IL-6-ELISA eingesetzt. Für diesen Zweck mußte der Antikörper biotinyliert werden. 1,35 mg des gelösten Antikörpers wurden zur Erhöhung der Proteinkonzentration zunächst über Nacht lyophilisiert und anschließend in 1,35 ml kaltem 0,05 M Natriumboratpuffer (pH 8,8) gelöst. Zur Entfernung von Aminen wurde die Antikörperlösung in einem Dialyserahmen gegen 0,05 M Natriumboratpuffer (pH 8,8) bei 4 °C

dialysiert. Nach vier und nach 20 Stunden erfolgte ein Wechsel des Außendialysats. Im Anschluß an die Dialyse wurde die Antikörperlösung bei Raumtemperatur mit Biotinamidocaproat N-Hydroxysuccimidester (150 µg/mg Antikörper) inkubiert. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von 1 M NH₄Cl (20 µl/250 µg Biotinamidocaproat N-Hydroxy-succimidester) nach vier Stunden gestoppt. Nach 10minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die biotinylierte Antikörperlösung bei 4 °C gegen PBS dialysiert. Der Wechsel des Außendialysats erfolgte nach 16 und nach weiteren vier Stunden. Durch Zugabe von 0,02 % (w/v) Natriumazid wurde die Antikörperlösung konserviert und konnte zur längeren Aufbewahrung bei -20 °C, zur regelmäßigen Benutzung bei 4 °C aufbewahrt werden.

2.2.13.2 Durchführung des IL-6-ELISAs

Tris-Stammlösung:

| | |
|--|---------|
| Tris [Tris-(hydroxymethyl)aminomethan]-HCl | 80,6 mM |
| Tris-Base | 19,5 mM |
| Thimerosal | 0,5 mM |
| pH 7,5 | |

TBS (*Tris buffered saline*):

| | |
|------------------|--------------|
| NaCl | 137,0 mM |
| KCl | 2,7 mM |
| Tris-Stammlösung | 10,0 % (v/v) |

Tween-Lösung:

| | |
|------------|--------------|
| Tween 20 | 10,0 % (v/v) |
| Thimerosal | 247,0 µM |

TBS-T:

| | |
|--------------|-------------|
| Tween-Lösung | 0,5 % (v/v) |
| in TBS | |

Diethanolamin-Puffer:

9,7 % (v/v) Diethanolamin wurden mit 800 ml H₂O gemischt und mit HCl (1 N) auf einen pH

Wert von 9,8 eingestellt. Im Anschluß daran wurden 0,5 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ zugesetzt und die Lösung auf 1 l aufgefüllt. Diethanolamin-Puffer wurde bei 4 °C aufbewahrt.

Als Matrix für den IL-6-spezifischen, monoklonalen „Festphasenantikörper“ MM600C vom Klon MP5-20F3 (Endogen) diente eine 96-Loch-Maxisorb-Mikrotiterplatte, die über Nacht bei 4 °C mit 100 µl/Loch des in PBS verdünnten (1:200) Antikörpers beschichtet wurde. Unfixierter Antikörper wurde mit Hilfe eines Biorad-„Immunowashers“ durch fünfmaliges Waschen der Vertiefungen mit je 400 µl/Loch TBS-T entfernt. Im Anschluß an die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 100 µl/Loch TBS, 1 % Boehringer Blocking Reagenz (1 Stunde bei Raumtemperatur) und dem Abwaschen der Blockierungslösung (s. o.) wurden 100 µl/Loch der zu untersuchenden Proben (unverdünnt oder in TBS, 1% Blocking Reagenz verdünnt) zugegeben. Nach 2 - 3ständiger Inkubation wurden die Proben abgewaschen (s. o.) und 100 µl/Loch des zweiten, IL-6 spezifischen, monoklonalen Antikörpers vom Klon 6 B4 [187] in einer Konzentration von 2 µg/ml TBS, 1 % Blocking Reagenz zugesetzt. Der einstündigen Inkubation und dem anschließenden Waschen (s. o.) folgte eine Inkubation mit 100 µl/Loch Streptavidin-Alkalische Phosphatase (1:2000 in TBS, 1 % Blocking Reagenz) über eine Stunde. Die Aktivität des Enzyms konnte nach achtmaligem Waschen (s. o.) durch eine Farbreaktion nachgewiesen werden. Als Enzymsubstrat diente 100 µl/Loch p-Dinitrophenylphosphat (0,1 %ig in Diethanolaminpuffer). Nach 3,5 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl/Loch NaOH (3 N) gestoppt und die Extinktion bei 405 nm gegen 690 nm bestimmt.

Die Inkubation der verschiedenen Lösungen erfolgte, mit Ausnahme der Fixierung des primären Antikörpers, auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler (Wellmixx 4), Stufe 1, bei Raumtemperatur. Die IL-6-Konzentration der Proben wurde anhand einer Standardkurve (nicht gezeigt) ermittelt. Bei dem Standard handelte es sich um murines rIL-6 mit einem Gehalt von 200000 U/ml bzw. 2 µg/ml und einer spezifischen Aktivität von $> 1 \times 10^8$ U/mg (Boehringer Mannheim). Der Standard wurde in einer 1:2-Verdünnungsreihe von 100 ng/ml bis 0,2 ng/ml austitriert. Die Nachweisgrenze des Tests lag bei ca. 1,6 ng/ml.

2.2.14 Bestimmung von MIP-1 α , MIP-2 und MCP-1 im ELISA

Die Konzentration der drei Chemokine MIP-1 α , MIP-2 und MCP-1 im Kulturüberstand bzw. im Serum oder in der Peritonealflüssigkeit von Mäusen wurde mittels „Quantikine™ M Immunoassays“ von R&D Systems bestimmt. Bei diesen Immunoassays handelt es sich um „Sandwich-ELISAs“ (siehe 2.2.13). Die Systeme waren mit allen Reagenzien ausgestattet, die für die Durchführung des jeweiligen ELISAs benötigt wurden. Dazu gehörten u. a. zwei mit einem polyklonalen Antikörper fixierte Mikrotiterplatten, ein zweiter, Enzym-konjugierter polyklonaler Antikörper, Enzymsubstrat und ein Chemokinstandard.

Den Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurde zunächst 50 µl/Loch „Assay Diluent“ zugesetzt und

direkt im Anschluß daran 50 µl/Loch der zu untersuchenden Probe. Diese wurde vorher gegebenenfalls mit „*Calibrator Diluent*“ verdünnt. Nach zweistündiger Inkubation wurden die Proben mit Hilfe eines Biorad-„*Immunowashers*“ abgesaugt und die Vertiefungen der Mikrotiterplatte fünfmal mit 400 µl/Loch „*Wash Buffer*“ (1:25 mit H₂O verdünnt) gespült. Der zweistündigen Inkubation mit 100 µl/Loch des zweiten Antikörpers (1:23 mit „*Conjugate Diluent*“ verdünnt) folgte ein erneutes fünfmaliges Waschen (s. o.) und die Zugabe von 100 µl/Loch „*Substrate Solution*“ (1 Teil *Color Reagent A* + 1 Teil *Color Reagent B*, v/v). Nach 30minütiger Inkubation im Dunkeln wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl/Loch „*Stop Solution*“ gestoppt.

Während des gesamten Tests erfolgte die Inkubation der verschiedenen Lösungen auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler (Wellmixx 4), Stufe 1, bei Raumtemperatur.

Die Chemokinkonzentration der Proben wurde anhand einer Standardkurve (nicht gezeigt) ermittelt. Der Standard wurde in lyophilisierter Form mitgeliefert und nach Auflösung in je 5 ml „*Calibrator Diluent*“ in einer 1:2-Verdünnungsreihe austitriert. Die Konzentration lag für MIP-1 α zwischen 2,4 und 150 pg/ml, für MIP-2 zwischen 4 und 250 pg/ml sowie für MCP-1 zwischen 8 und 500 pg/ml. Die höchste Verdünnung stellt gleichzeitig die Nachweisgrenze des jeweiligen Tests dar.

2.2.15 Statistik

Die Daten der Leukozyteninfiltration sowie die Ergebnisse der *in vivo* Freisetzung von Zyto- und Chemokinen wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Zur Kalkulation statistischer Signifikanzen wurde der Student's T-Test durchgeführt. Verglichen wurden dabei experimentelle Mittelwerte zweier unabhängiger Stichproben (*unpaired two sample t-test*). In Fällen, in denen die Kontrollwerte unterhalb der Nachweisgrenze des jeweiligen Tests lagen, wurde der „*one sample t-test*“ durchgeführt. Hierbei wird der experimentelle Mittelwert mit einem theoretischen Mittelwert verglichen. Dieser theoretische Mittelwert μ_T wurde mit der Nachweisgrenze gleichgesetzt. Als signifikant wurde ein p-Wert von $< 0,05$ betrachtet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Liposomen als Träger und Transportsystem des Makrophagen stimulierenden mykoplasmalen Lipopeptids MALP-2

Die intravenöse Injektion von *M. fermentans*-Membranen in Kaninchen führt zu einer nach zwei Stunden maximalen Erhöhung der Körpertemperatur um 0,6 °C [126]. Durch die intravenöse Injektion von HPCL (*high-performance liquid chromatography*)-gereinigtem „MDHM“ („*M. fermentans*-derived high-molecular-weight material“, es handelt sich hierbei um die frühere und inzwischen durch MALP-2 ersetzte Bezeichnung für eine Makrophagen stimulierende Aktivität aus *M. fermentans*) konnte dieser pyrogene Effekt nicht hervorgerufen werden (nicht veröffentlicht). *In vitro* hingegen besitzt auch das HPCL-gereinigte „MDHM“ die Fähigkeit, Makrophagen zur Freisetzung der endogenen Pyrogene IL-1, IL-6 und TNF- α zu stimulieren [126]. Das abweichende *in vitro* und *in vivo* Verhalten kann sowohl auf eine vorzeitige Inaktivierung als auch auf eine schnelle Ausscheidung des Wirkstoffes *in vivo* zurückzuführen sein. Beides hätte zur Folge, daß die Makrophagen stimulierende Aktivität der Mykoplasmen die Zielzellen (Makrophagen) nicht erreichen und sie somit zur Synthese und Freisetzung der endogenen Pyrogene nicht aktivieren kann.

Um die natürliche Situation, in der MALP-2 in die Zytoplasmamembran von *M. fermentans* inkorporiert ist, so gut wie möglich simulieren zu können, wurde ein synthetisches Membransystem erstellt, mit dessen Hilfe der direkte Kontakt von MALP-2 und Makrophagen gewährleistet werden sollte. Ein entsprechendes Membransystem stellen Liposomen dar, vesikuläre Partikel aus konzentrischen Lipiddoppelschichten, die nach Injektion von den phagozytierenden Zellen des Wirtsorganismus schnell eliminiert werden. Liposomen wurden erstmalig Anfang der sechziger Jahre [7] beschrieben und fanden zunächst als Modellmembranen Verwendung. Später entdeckte man ihre Eignung als Wirkstoffträger (*drug carrier*), Transportsysteme (*drug targeting*) und parenterale Wirkstoffdepots für Substanzen unterschiedlichster Art.

3.1.1 Vorversuche mit Liposomen aus PC:PS:Cholesterol

Für die Beurteilung hergestellter Liposomen hinsichtlich ihrer Eignung für weiterführende *in vitro* und *in vivo* Versuche wurden verschiedene Kriterien berücksichtigt:

- I. Praktische Kriterien:
 - Morphologie und Homogenität der Liposomen (Größe und Form)
 - Ausbeute an Liposomen
- II. Effizienz der MALP-2-Inkorporation
- III. Wechselwirkungen mit Makrophagen

Liposomen sind kugelförmige vesikuläre Partikel, während Mykoplasmen, wenn sie sich im Zustand optimalen Wachstums befinden, filamentöse Formen annehmen (siehe Abb. 1). Die Herstellung von Liposomen mit einer Mykoplasmen entsprechenden Morphologie war infolgedessen nicht möglich. Das vorrangige Ziel bestand daher in der reproduzierbaren Konstruktion von in Form und Größe homogenen Liposomen mit hoher MALP-2-Einbaurate und gesteigerter Fähigkeit zur Interaktion mit Makrophagen.

1992 wurde von Lee et al. [97] nachgewiesen, daß aus PC:PS:Cholesterol (1:1:1; molares Verhältnis) konstruierte Liposomen von Zellen der murinen Makrophagenzelllinie J774 stärker gebunden (4 °C) und phagozytiert (37 °C) werden als aus PC:Cholesterol (2:1; molares Verhältnis) bestehende Liposomen. Die verstärkte Bindung und Phagozytose ist auf das Vorhandensein negativ geladener Phospholipide in der Liposomenmembran zurückzuführen und kann ebenfalls durch den Einbau anderer anionischer Phospholipide, wie z. B. PG oder Phosphatidylsäure induziert werden [97]. Aufbauend auf den Versuchen von Lee et al. wurden Liposomen aus PC:PS:Cholesterol (1:1:1, molares Verhältnis) mittels Detergenzentfernung hergestellt. Bei der Detergenzentfernung handelt es sich um eine Methode, die auch im kleinen Maßstab noch gut durchgeführt werden kann und die sich besonders dann eignet, wenn lipophile Proteine in die Liposomenmembran inkorporiert werden sollen [134]. Diese Bedingungen waren aufgrund der Tatsache, daß zu Beginn der Arbeit noch kein synthetisches MALP-2, sondern nur das aus Mykoplasmen isolierte und HPLC-gereinigte MDHM in kleinen Mengen zur Verfügung stand, erfüllt. Auch die aus Gründen der optimalen Aktivität erfolgte Solubilisierung von MDHM in OG [127] kam dieser Herstellungsmethode entgegen.

Abb. 4 zeigt das Fließschema zur Herstellung von Liposomen aus PC:PS:Cholesterol (1:1:1; molares Verhältnis). Für die Herstellung von Liposomen anderer Zusammensetzung behält dieses Schema seine Gültigkeit.

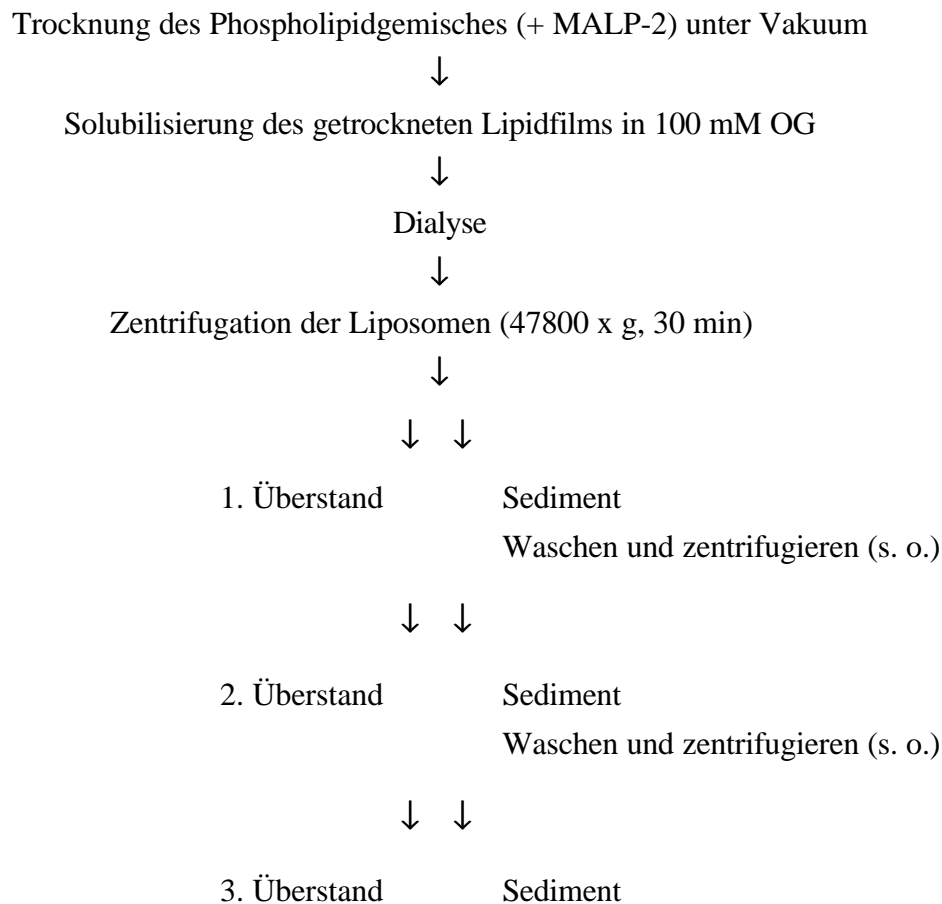


Abbildung 4: Fließschema zur Liposomenherstellung

Um eine erste Begutachtung durchführen zu können, wurde den Liposomen bei der Herstellung 0,005 μMol des fluoreszierenden Phospholipids NBD-PE zugesetzt, so daß die erhaltene Suspension unter einem mit Fluoreszenzlampe ausgestatteten Lichtmikroskop sichtbar gemacht werden konnte. Auf diese Weise war es möglich, stark inhomogene Liposomensuspensionen schnell auszumachen und zu verwerfen. Die Beurteilung von Form und Größe sowie Lamellarität einer homogenen Liposomensuspension wurde dann mittels Negativ-Kontrastierung am Transmissionselektronenmikroskop durchgeführt. Die aus PC:PS:Cholesterol (1:1:1; molares Verhältnis) bestehenden Liposomen waren multilamellar und von kugeliger Gestalt. Ihr Durchmesser lag zwischen 0,6 und 1,2 μm (nicht gezeigt). Die Inkorporation von MALP-2 hatte keinen Einfluß auf das Aussehen der Liposomen.

3.1.1.1 Die Stimulation muriner Peritonealmakrophagen durch MALP-2-haltige Liposomen aus PC:PS:Cholesterol induzierte die Freisetzung von NO

Das mykoplasmales Lipoprotein MALP-2 ist *in vitro* ein potenter Makrophagenstimulator, dessen Makrophagen stimulierende Aktivität die anderer bakterieller Lipoproteine, wie z. B. von *E. coli* [69, 119] oder *Borellia burgdorferi* und *Treponema pallidum* [142], um ein Viel-faches übertrifft

[128]. Der Nachweis dieser hohen Aktivität gelingt mit einem entsprechend empfindlichen biologischen Test, dem sogenannten “NO-Test”. Mit Hilfe dieses Tests kann durch die Stimulation IFN- γ -stimulierter, muriner Peritonealmakrophagen aus C3H/HeJ-Mäusen die Aktivität von MALP-2 bzw. einer beliebigen Substanz anhand des freigesetzten Stickstoffmonoxid (NO) schnell, kostengünstig und reproduzierbar ermittelt werden. Das durch die Makrophagen in den Kulturüberstand freigesetzte und unmittelbar nach seiner Bildung zu Nitrat und Nitrit oxidierte NO wird hierbei, nach enzymatischer Reduktion von Nitrat zu Nitrit und einer anschließenden Diazokupplungs-Reaktion, durch Messung der Nitritkonzentration bei 550 nm im ELISA-Reader bestimmt. Ein im jeden NO-Test eingesetzter laborinterner Standard, eine in bezug auf die Aktivität stabile Präparation aus Mykoplasmenmembranen, erlaubt hierbei die Definition einer Unit Makrophagen stimulierender Aktivität als die Konzentration, welche zu halbmaximaler NO-Freisetzung führt [127]. Die für den Test verwendeten Peritonealmakrophagen stammen aus C3H/HeJ Inzuchtmäusen. Hierbei handelt es sich um Mäuse, die aufgrund eines genetischen Defektes gegenüber der toxischen Wirkung von LPS resistent sind [139]. Die Zellen dieser Mäuse werden im NO-Test verwendet, um die Makrophagen stimulierende Wirkung einer potentiellen LPS-Kontamination zu minimieren.

Durch den Einsatz der aus PC:PS:Cholesterol (1:1:1; molares Verhältnis) bestehenden Liposomen mit inkorporiertem MALP-2 im NO-Test konnte überprüft werden, ob überhaupt und mit welcher Effizienz ein Einbau von MALP-2 in die Liposomenmembran stattgefunden hatte. Die Vorverdünnung der Liposomen in 25 mM OG hatte dabei den Zweck, die Liposomenstruktur zu zerstören, um die Makrophagen stimulierende Aktivität aus der Vesikelmembran herauszulösen. Auf diese Weise konnte eine optimale Solubilisierung von MALP-2 in OG erzielt und Aufschluß über den ursprünglich in der Liposomenmembran inkorporierten Anteil gewonnen werden. Unterblieb die Vorverdünnung der Liposomen in OG, so ergab sich daraus die Makrophagen stimulierende Aktivität des partikelgebundenen MALP-2. Entsprechend der Ergebnisse von Mühlradt und Frisch [127] war diese weitaus geringer als die Makrophagen stimulierende Aktivität des optimal in OG solubilisierten MALP-2 (Abb. 5). Ca. 60 % des ursprünglich bei der Liposomenherstellung eingesetzten MALP-2 wurden, basierend auf den Ergebnissen des NO-Tests, in die Membran der dreifach gewaschenen Liposomen inkorporiert.

Durch die Überprüfung der MALP-2-haltigen Liposomen im NO-Test konnte gezeigt werden, daß eine prinzipielle Inkorporation von MALP-2 in Liposomen möglich war. Die Fähigkeit von MALP-2 zur Makrophagenstimulierung *in vitro* wurde durch die Inkorporation in die Liposomen zwar abgeschwächt, ging aber nicht verloren. Kontroll-Liposomen ohne MALP-2 waren nicht in der Lage, Makrophagen zur Freisetzung von NO zu stimulieren.

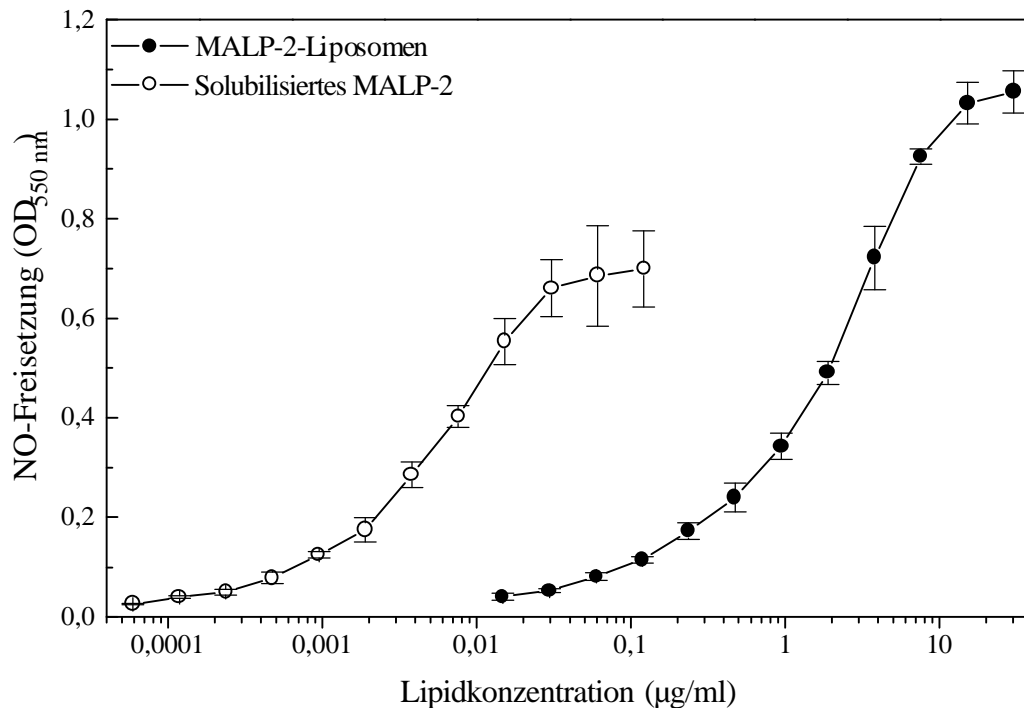


Abbildung 5: Vergleich der Makrophagen stimulierenden Aktivität von Liposomen-inkorporiertem und solubilisiertem MALP-2 im NO-Test. MALP-2-haltige Liposomen aus PC:PS:Cholesterol (1:1:1; molares Verhältnis) wurden in 25 mM OG oder Medium vorverdünnt, in einer 1:2-Verdünnungsreihe ausstitriert und zusammen mit 60 U/ml IFN- γ und PEC aus C3H/HeJ-Mäusen (1×10^5 Zellen pro Loch) bei 37 °C und 7,5 % CO₂ inkubiert. Die Bestimmung von NO im Kulturüberstand erfolgte nach ca. 48 Stunden. Die Meßdaten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus jeweils drei Parallelkulturen.

3.1.1.2 Die Inkorporation von MALP-2 hatte auf die Phagozytose von Liposomen aus PC:PS:Cholesterol keinen Einfluß

Makrophagen tragen auf ihrer Oberfläche neben Fc γ - und Komplementrezeptoren, mit deren Hilfe sie opsonisierte Partikel aufnehmen, auch Rezeptoren für verschiedene mikrobielle Bestandteile, wie z. B. bakterielle Kohlenhydrate oder Lipopolysaccharide. Diese Rezeptoren ermöglichen den Makrophagen die Erkennung der eingedrungenen Mikroorganismen und somit deren Zerstörung. Bei einer Infektion mit *M. fermentans* würde MALP-2 als ein Bestandteil der Zytoplasmamembran in einen direkten Kontakt mit phagozytierenden Makrophagen treten. Obwohl es für das Vorhandensein eines MALP-2-Rezeptors auf Makrophagen bisher keinen Hinweis gab, wurde der mögliche Einfluß von inkorporiertem MALP-2 auf die Aufnahme der Liposomen durch Peritonealmakrophagen analysiert. Zu diesem Zweck wurde mit Hilfe radioaktiv markierter Liposomen der Anteil phagozytierter Liposomen mit bzw. ohne inkorporiertem MALP-2 verglichen. Die Versuchsbedingungen wurden denen des NO-Tests angepaßt, d. h. die Inkubation der in einer 1:2-Verdünnungsreihe (100 μ l/Loch) ausstitrierten Liposomen mit den murinen Peritonealmakrophagen erfolgte über einen Zeitraum von 48 Stunden. Dabei betrug die Liposomenkonzentration im

ersten Loch der Mikrotiterplatte ca. 30 µg Lipid/ml, im sechsten Loch 1 µg Lipid/ml. Auf diesem Weg konnte gleichzeitig die für dieses Testsystem optimale Liposomenkonzentration ermittelt werden. Nach 48 Stunden wurden die nichtphagozytierten Liposomen abgewaschen und die adhärennten Makrophagen mittels NaOH lysiert. Durch die Bestimmung der Radioaktivität dieser NaOH-Lösungen konnte der prozentuale Anteil phagozytierter Liposomen pro Verdünnungsstufe berechnet werden. Eine Adsorption der Liposomen an andere im Peritonealraum vorkommende Zellen wurde durch deren Abtrennung ausgeschlossen. Es handelte sich bei diesen Zellen in erster Linie um B-Lymphozyten und zu einem geringen Prozentsatz auch um Mastzellen und T-Lymphozyten. Der Prozentsatz phagozytierender Granulozyten im Peritonealraum einer gesunden Maus liegt nicht über 2 % [120].

Ein Unterschied zwischen Kontroll-Liposomen und MALP-2-haltigen Liposomen bezüglich der prozentualen Aufnahme durch Peritonealmakrophagen konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 6). Das Vorhandensein von MALP-2 in der Vesikelmembran hatte somit weder einen fördernden noch einen hemmenden Einfluß auf deren Phagozytose. Diese begann sowohl bei den MALP-2-haltigen als auch bei den Kontroll-Liposomen suboptimal und erreichte erst in der fünften Vertiefung der Mikrotiterplatte, bei einer Liposomenkonzentration von ca. 2 µg Lipid/ml (0,2 µg Lipid/Loch), ein Maximum.

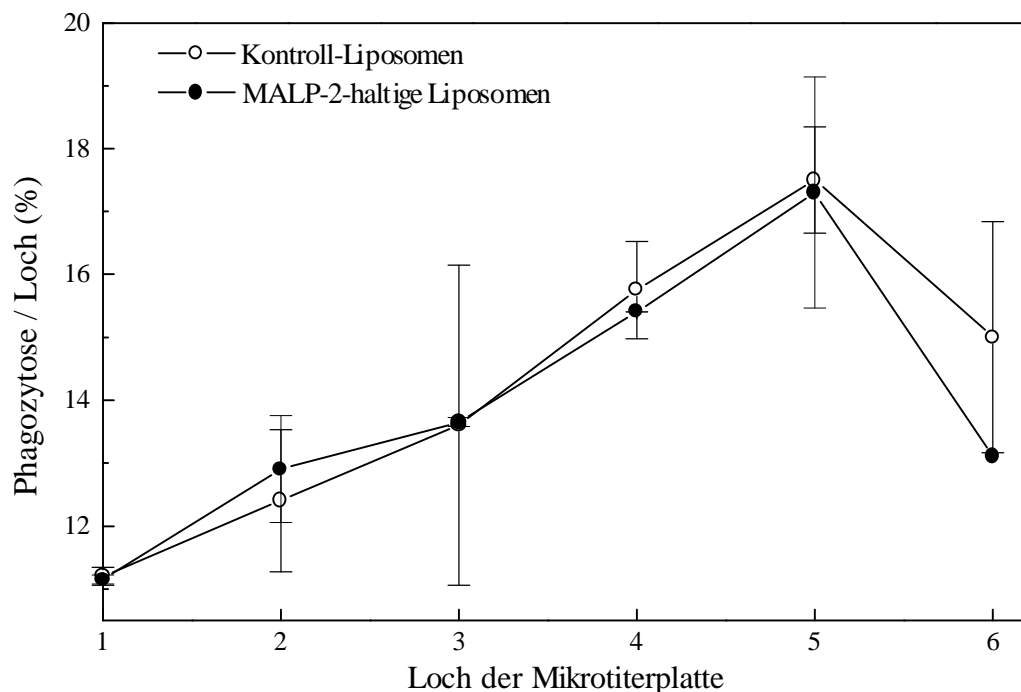


Abbildung 6: Vergleich der Phagozytose MALP-2-haltiger Liposomen und Kontroll-Liposomen durch murine Peritonealmakrophagen. Adhärennte Peritonealmakrophagen aus C3H/HeJ-Mäusen wurden mit [^{14}C]-markierten und in einer 1:2-Verdünnungsreihe austitrierten Liposomen (PC:PS:Cholesterol, 1:1:1; molares Verhältnis) in 96-Loch-Mikrotiterplatten inkubiert (100 µl/Loch). In den Kontrollansätzen fehlten die Zellen. Nach 48 Stunden Inkubation bei 37 °C und 7,5 % CO_2 wurden die nichtphagozytierten Liposomen abgewaschen und die Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit 0,1 N NaOH gespült. Die Radioaktivität der NaOH-

Lösungen wurde im Szintillationszähler bestimmt. Die Meßdaten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus jeweils zwei Parallelkulturen, die Mittelwerte der Kontrollen (Vertiefungen ohne Zellen) wurden subtrahiert.

Bei der Durchführung dieses Vorversuchs wurde davon ausgegangen, daß die im Zuge der Herstellung auftretenden Verluste von Liposomen beim Waschen und Zentrifugieren weitgehend vernachlässigbar sowie zwischen Kontroll-Liposomen und MALP-2-haltigen Liposomen vergleichbar wären. Da sich diese Annahme später als nicht unbedingt zutreffend herausstellte, muß für diesen Versuch die Einschränkung gemacht werden, daß möglicherweise ungleich konzentrierte Liposomensuspensionen eingesetzt wurden, die dann zu einer identischen Phagozytoserate führten.

3.1.1.3 Die iv-Injektion von MALP-2-haltigen Liposomen aus PC:PS:Cholesterol in Kaninchen induzierte keine signifikante Temperaturerhöhung

Kaninchen reagieren, wie eingangs erwähnt (siehe 3.1), auf die intravenöse Injektion von 160 μ g *M. fermentans*-Membranen (entspricht einer Makrophagen stimulierenden Aktivität von ca. 32 kU) mit einer Erhöhung der Körpertemperatur um 0,6 °C etwa zwei Stunden nach Injektion [126]. Durch die Injektion MALP-2-haltiger Liposomen aus PC:PS:Cholesterol (1:1:1; molares Verhältnis) mit einer Makrophagen stimulierenden Aktivität von ca. 60 kU konnte hingegen keine signifikante Temperaturerhöhung induziert werden. Lediglich bei einem von drei Kaninchen stieg die Körpertemperatur drei Stunden nach Injektion um 0,5 °C an. Die Injektion von Kontroll-Liposomen hatte bei keinem der drei Kaninchen eine Veränderung der Temperatur zur Folge (nicht gezeigt).

Mit dem Pyrogenitätstest im Kaninchen konnte gleichzeitig überprüft werden, ob die Liposomen-Präparationen eine eventuelle LPS-Kontamination aufwiesen. LPS induziert im Kaninchen eine nach ca. 20 Minuten einsetzende, biphasische Temperaturerhöhung [31]. Da die Injektion der Liposomen bei keinem der sechs eingesetzten Kaninchen eine derartige Erhöhung der Körpertemperatur zur Folge hatte, konnte eine LPS-Kontamination der MALP-2-haltigen Liposomen und der Kontroll-Liposomen ausgeschlossen werden. Die Fieberversuche wurden freundlicherweise von Herrn Dr. H. Ronneberger (Hoechst Marion Roussel, Marburg) durchgeführt.

3.1.2 *In vitro* Vorversuche mit Liposomen unterschiedlicher Zusammensetzung

Die erfolgreiche Inkorporation von MALP-2 in Liposomen und deren Fähigkeit zur *in vitro* Stimulation muriner Peritonealmakrophagen (siehe 3.1.1.1) sprachen, trotz der unzureichenden

in vivo Aktivität, für einen vielversprechenden experimentellen Ansatz. Durch die Herstellung neuer Liposomen mit veränderter Zusammensetzung sollte die *in vivo* Aktivität der Liposomen optimiert werden. Aus der Literatur bekannte Kriterien wurden berücksichtigt, um eine gesteigerte Aufnahme der Liposomen durch Makrophagen zu gewährleisten. Dazu gehörten:

- eine reduzierte Cholesterolkonzentration

Nach Patel et al. wird durch einen erhöhten Cholesterolanteil in der Vesikelmembran die Phagozytose von Liposomen verzögert, die Verweildauer im Blut hingegen verlängert [137]. Beide Effekte widersprachen den Zielen eigener Untersuchungen.

- eine hohe Konzentration negativ geladener Phospholipide

Die Phagozytose von Liposomen wird durch den Zusatz negativ geladener Phospholipide in die Vesikelmembran erhöht. Dieser Effekt ist bei Verwendung der murinen Makrophagenzelllinie J774 ab einem Zusatz von 30 Mol % PS, PG oder Phosphatidylinositol zu beobachten und kann durch eine Konzentrationserhöhung der jeweiligen Phospholipide noch verstärkt werden [97].

- eine Inkorporation von Phosphatidyl-L-Serin

Durch die Inkorporation von mehr als 2 Mol % PS in Liposomen aus PC:Sphingomyelin:Gangliosid GM1 (1:1:0,14; molares Verhältnis) wird die Zirkulation der Liposomen im Blut reduziert und ihre Aufnahme durch Leber und Milz gesteigert. Dieser Effekt kann durch die Inkorporation vergleichbarer Konzentrationen anderer anionischer Lipide, wie z. B. Phosphatidsäure oder Sulfoglycosylsphingolipid nicht erzielt werden [4]. Die Phagozytosesteigernde Wirkung von PS beschränkt sich jedoch auf Phosphatidyl-L-Serin [40].

- eine Herstellung von Liposomen "bewährter" Zusammensetzung

Nach Schroit und Fidler werden Liposomen mit der Zusammensetzung PC:PS (7:3; molares Verhältnis) von Makrophagen effizient gebunden und schnell phagozytiert. Wenige Stunden nach iv-Injektion sind hohe Konzentrationen in makrophagenreichen Organen wie Leber und Milz, aber auch in der Lunge nachweisbar [161].

Folgende Liposomen wurden entsprechend dieser Kriterien hergestellt:

I) PG:PC:Cholesterol (1,08:1:0,25; molares Verhältnis)

Bei diesen Liposomen wurde im Vergleich zu den bisher verwendeten Liposomen (PC:PS:Cholesterol, 1:1:1; molares Verhältnis) der Cholesterolgehalt verringert. Da jedoch Cholesterol zum einen die Stabilität der Liposomen erhöht [137], zum anderen auch in der Zytoplasmamembran von Mykoplasmen enthalten ist [29], wurde auf den Zusatz nicht vollständig verzichtet. Mit dem Ziel, Liposomen herzustellen, deren Zusammensetzung der mykoplasmaalen Zytoplasmamembran ähnelt, wurde zusätzlich PS durch PG ersetzt. Mit ca. 20 % aller polaren Lipide zählt PG zu einer der Hauptkomponenten der Zytoplasmamembran von *M. fermentans* [29]. Auf diese Weise sollte die Fähigkeit von Makrophagen, Mykoplasmen erkennen und phagozytieren zu können, für die eigenen Versuche genutzt werden. Die mittels Detergenzentfernung (siehe 3.1.1) hergestellten Liposomen dieser Zusammensetzung waren multilamellar, von

kugeliger Gestalt und hatten einen Durchmesser von ca. 200 - 450 nm (nicht gezeigt). Im Lichtmikroskop war das Vorhandensein einzelner Aggregate erkennbar.

II) PG:PS:Cholesterol (1,08:1:0,25; molares Verhältnis)

Um eine hohe Konzentration anionischer Phospholipide zu erlangen, wurde bei der Herstellung dieser Liposomen (ebenfalls mittels Detergenzentfernung, siehe 3.1.1) das neutrale Phospholipid PC der PG:PC:Cholesterol-Liposomen (1,08:1:0,25; molares Verhältnis) durch das negativ geladene Phospholipid PS ersetzt. Durch Verwendung von Phosphatidyl-L-Serin wurde die spezifische Erkennung dieser stereoisomeren Form durch Makrophagen berücksichtigt [40]. Die entstandene Liposomensuspension war relativ homogen und setzte sich aus runden, multilamellaren Vesikeln mit einem Durchmesser von ca. 150 - 350 nm zusammen (Abb. 7). Vereinzelt waren auch größere (ca. 700 nm) bzw. kleinere (< 100 nm) Liposomen vorhanden. Die Existenz von Aggregaten war vernachlässigbar.



Abbildung 7: Transmissionselektronenmikroskopie. Negativ-Kontrastierung von Liposomen aus PG:PS:Cholesterol (1,08:1:0,25; molares Verhältnis). Vergrößerung: 20000fach.

III) PC:PS (7:3; molares Verhältnis)

Die Herstellung von Liposomen dieser Zusammensetzung mittels Detergenzentfernung führte zur Ausbildung pleomorpher Strukturen. Diese waren fadenförmig bis kugelig und stark aggregiert. Eine 5minütige Behandlung im Ultraschallbad löste diese Aggregate nur unzureichend auf (Abb. 8). Erst nach einer fast 6stündigen, durch Kontrollen im Lichtmikroskop unterbrochenen Beschallung konnte die Anzahl der Aggregate vermindert, nicht aber vollständig aufgelöst werden. Die so entstandene Suspension war stark inhomogen und wies kugelige Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 50 - 650 nm auf (nicht gezeigt).

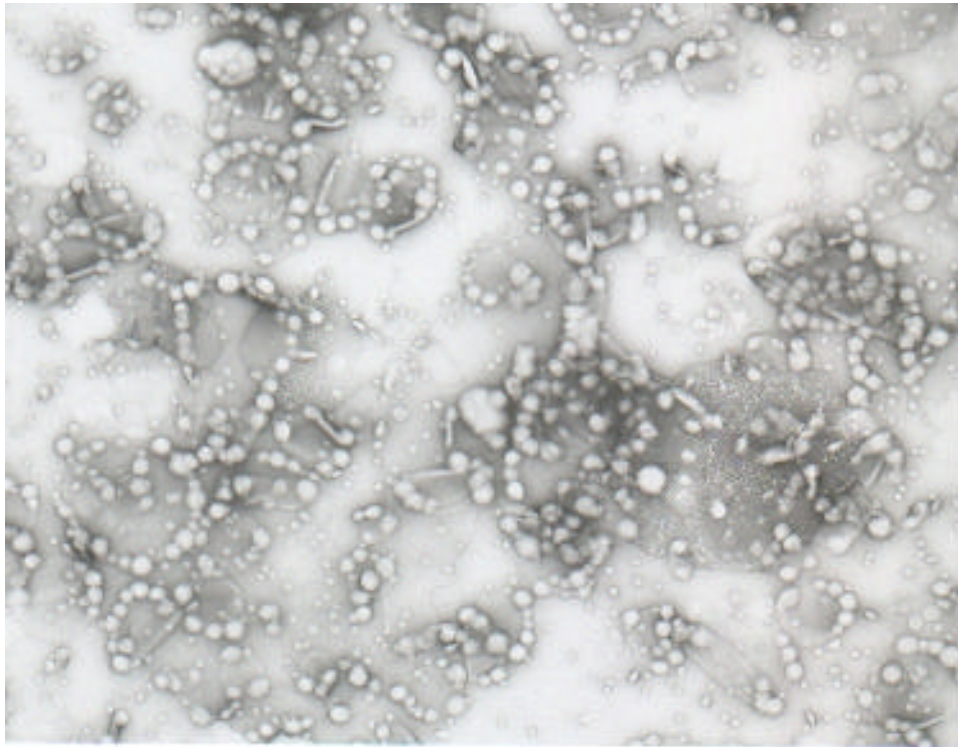


Abbildung 8: Transmissionselektronenmikroskopie. Negativ-Kontrastierung von Liposomen aus PC:PS (7:3, molares Verhältnis) nach 5minütiger Beschallung im Ultraschallbad. Vergrößerung: 20000fach.

3.1.2.1 Die Konzentration des inkorporierten MALP-2 war abhängig von der Liposomenzusammensetzung

Mit Hilfe des NO-Tests wurde untersucht, mit welcher Effizienz MALP-2 in die unter 3.1.2 beschriebenen Liposomen unterschiedlicher Zusammensetzung inkorporiert werden konnte. Bei der Herstellung wurde pro Liposomenansatz jeweils die gleiche Konzentration an MALP-2 eingesetzt. Nach erfolgter Dialyse und Zentrifugation lag die halbmaximale Aktivität der Liposomen aus PG:PS:Cholesterol (1,08:1:0,25; molares Verhältnis) bei 1 - 2 ng Lipid/ml, die der Liposomen aus PG:PC:Cholesterol (1,08:1:0,25; molares Verhältnis) und PC:PS (7:3; molares Verhältnis) bei 7 bzw. 10 ng Lipid/ml (Abb. 9).

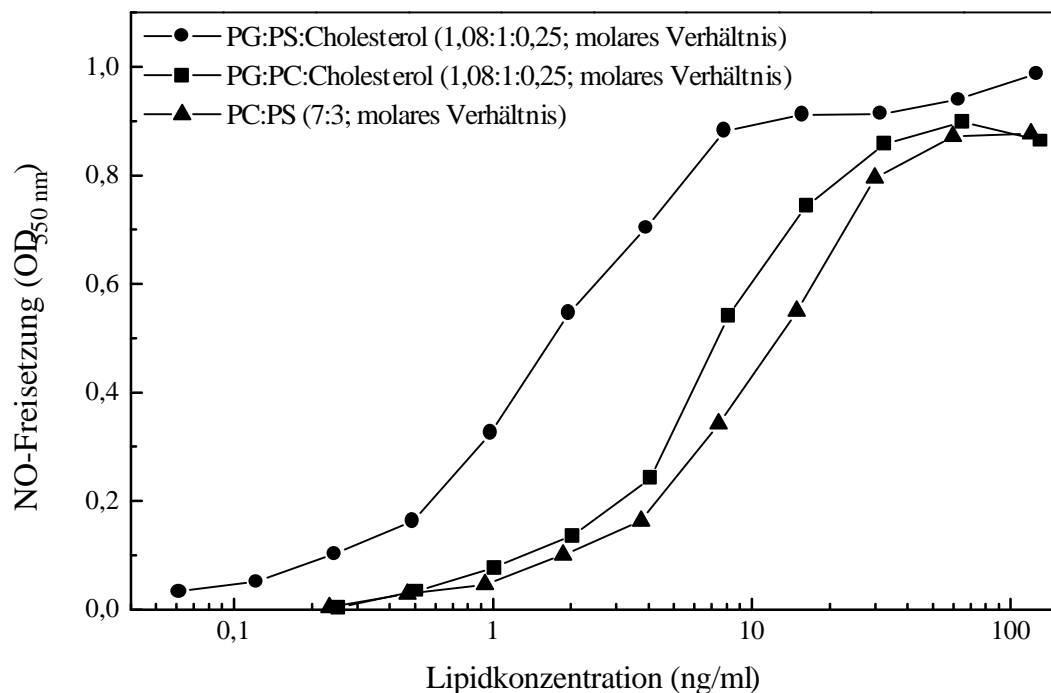


Abbildung 9: Einfluß der Liposomenzusammensetzung auf die Inkorporation von MALP-2. Liposomen unterschiedlicher Zusammensetzung wurden in 25 mM OG vorverdünnt, in einer 1:2-Verdünnungsreihe ausstitriert und zusammen mit 60 U/ml IFN- γ und PEC aus C3H/HeJ-Mäusen (1×10^5 Zellen/Loch) bei 37 °C und 7,5 % CO₂ inkubiert (n = 1). Die Bestimmung von NO erfolgte nach ca. 45 Stunden.

Wie bereits unter 3.1.1.2 wurde auch bei diesem Versuch davon ausgegangen, daß die durch Wasch- und Zentrifugationsschritte auftretenden Verluste an Liposomen vernachlässigbar und zwischen den Liposomen unterschiedlicher Zusammensetzung vergleichbar waren. Durch die Bestimmung der Makrophagen stimulierenden Aktivität der Waschüberstände zeigte sich jedoch, daß die Waschüberstände von PC:PS-Liposomen eine siebenfach höhere Aktivität besaßen als die von PG:PS:Cholesterol-Liposomen (nicht gezeigt). Ob dieser Unterschied in erster Linie auf das Vorhandensein sehr kleiner (ca. 50 nm) und somit bei der Zentrifugation nicht sedimentierender Liposomen oder aber auf eine hohe Konzentration an nichtinkorporiertem MALP-2 zurückzuführen war, wurde nicht ermittelt. Der leicht fluoreszierende Waschüberstand nach Zentrifugation der PC:PS-Liposomen ließ allerdings auf einen relativ hohen Anteil nichtsedimentierter Liposomen schließen. Im Ansatz aus PG:PS:Cholesterol waren entsprechend kleine und somit bei der Zentrifugation nichtsedimentierende Liposomen nicht bzw. nur im geringen Umfang vorhanden.

Fazit dieses Versuches war, daß die bezüglich der Präparationsmethode (siehe Abb. 4) konstanten Herstellungsbedingungen zu Liposomensuspensionen unterschiedlicher Aktivität führten. Da das Waschen der Liposomen nach der Dialyse zwingend notwendig war, um nichtinkorporiertes MALP-2 zu entfernen, konnte auf diesen Herstellungsschritt nicht verzichtet werden. Aufgrund dieser Tatsache, aber auch weil die aus PC:PS (7:3; molares Verhältnis) hergestellten Liposomen

sehr inhomogen hinsichtlich Form und Größe waren, wurde auf die weitere Verwendung von Liposomen dieser Zusammensetzung verzichtet. Die Unterschiede zwischen Liposomen aus PG:PC:Cholesterol (1,08:1:0,25; molares Verhältnis) und PG:PS:Cholesterol (1,08:1:0,25; molares Verhältnis) waren in bezug auf Form und Größe sowie Homogenität nur sehr gering. Da unter den gegebenen Bedingungen PG:PS:Cholesterol-Liposomen jedoch 3 - 4 mal aktiver waren als PG:PC:Cholesterol-Liposomen, wurden erstere für die Durchführung weiterer Versuche ausgewählt.

3.1.2.2 Die Inkorporation von Lactosylceramid oder *M. fermentans*-Lipid in Liposomen aus PG:PS:Cholesterol hatte keinen Einfluß auf die Phagozytose

Mit dem Ziel, die Wechselwirkungen zwischen Liposomen und Makrophagen weiter zu steigern, wurde die Liposomenmembran durch die Inkorporation von Lactosylceramid und *M. fermentans*-Lipid modifiziert.

Makrophagen verfügen über eine Vielzahl von Rezeptoren, die für die Erkennung von zur Phagozytose vorgesehener Partikel von Bedeutung sind. Dazu gehören u. a. Rezeptoren für Kohlenhydrate. Durch die Inkorporation von Lactosylceramid in die Liposomenmembran sollte somit eine gesteigerte Phagozytose ermöglicht werden.

Die Bindung Lactosylceramid-haltiger Partikel erfolgt über den Galaktose-Partikel-Rezeptor, der sowohl auf Kupfferzellen [85] als auch auf murinen Peritonealmakrophagen [75] exprimiert ist. Eine Verankerung von Galaktosylresten (15 Mol % Galaktose) an der Oberfläche von Liposomen aus PC:Cholesterol:4-(p-Maleimidophenyl)butyryl-PE (8,5:5:1,5) führt nach Haensler und Schuber [56] zu einer im Vergleich zu Kontroll-Liposomen vierfach erhöhten Phagozytose durch Peritonealmakrophagen. *In vivo* bedingt die Inkorporation von 8 Mol % Lactosylceramid in die Liposomenmembran eine nach iv-Injektion reduzierte Verweildauer der Liposomen im Blut und eine damit einhergehende gesteigerte Aufnahme durch die Leber [167, 168].

Die in dieser Arbeit mittels Detergenzentfernung hergestellten Liposomen aus PG:PS:Cholesterol:Lactosylceramid (1,08:1:0,25:0,25; molares Verhältnis) waren lichtmikroskopisch von Kontroll-Liposomen ohne Lactosylceramid nicht zu unterscheiden (nicht gezeigt).

Mit der Inkorporation von *M. fermentans*-Lipid in die Liposomenmembran wurde versucht, die natürlich vorliegende Situation, in der MALP-2 in die Zytoplasmamembran der Mykoplasmen eingelagert ist, stärker als bisher zu imitieren. Bei den Membranlipiden der Mykoplasmen handelt es sich in erster Linie um Phospholipide, Glykolipide und Sterole. Neutrale Lipide sind dagegen nur in geringen Konzentrationen vorhanden [zusammengefaßt in 152]. Um die Frage zu klären, ob der Einbau dieser mykoplasmaalen Lipide in die Liposomenmembran einen Einfluß auf die Phagozytose hat, wurden 25 % *M. fermentans*-Lipid in Liposomen aus PG:PS:Cholesterol (1,08:1:0,25; molares Verhältnis) eingebaut. Liposomen dieser Zusammensetzung waren von

regelmäßiger, kugelig Form. Hinsichtlich der Größe variierten diese allerdings stärker als Liposomen ohne *M. fermentans*-Lipid (nicht gezeigt).

Neben der Liposomenzusammensetzung spielen auch die Liposomengröße und die Liposomenkonzentration eine entscheidende Rolle für die *in vitro* Phagozytose. So bedingt in einem *in vitro*-Testsystem die Liposomengröße die Sedimentationsgeschwindigkeit: Große Liposomen sedimentieren schneller als kleine Liposomen und können daher entsprechend schneller von adhärennten Makrophagen phagozytiert werden. Auch *in vivo* erfolgt die Entfernung großer, multilamellarer Liposomen aus der Blutbahn schneller als die kleiner, unilamellarer Vesikel [82]. Daß auch die Liposomenkonzentration einen Einfluß auf die Phagozytose hat, wurde bereits unter 3.1.1.2 ermittelt: So war der prozentuale Anteil der durch Peritonealmakrophagen aufgenommenen Liposomen aus PC:PS:Cholesterol (1:1:1; molares Verhältnis) bei hohen Liposomenkonzentrationen suboptimal und erreichte erst nach mehreren Verdünnungsschritten ein Maximum. Dieser Zusammenhang konnte bei Liposomen aus PG:PS:Cholesterol (1,08:1:0,25; molares Verhältnis) jedoch weder mit noch ohne Zusatz von Lactosylceramid oder *M. fermentans*-Lipid beobachtet werden (nicht gezeigt).

In einem folgenden Versuch wurde dann der Einfluß von Lactosylceramid und *M. fermentans*-Lipid auf die Phagozytoserate von Liposomen aus PG:PS:Cholesterol (1,08:1:0,25; molares Verhältnis) untersucht. Um zu gewährleisten, daß die von den Makrophagen bei kurzen Inkubationszeiten aufgenommene Radioaktivität (in cpm) ausreichend hoch, d. h. meßbar war, wurde mit ca. 3 µg Lipid/Loch (30 µg Lipid/ml) eine 10-fach höhere Liposomenkonzentration, und somit eine entsprechend höhere Radioaktivität, eingesetzt als unter 3.1.1.2 beschrieben. Unter diesen Versuchsbedingungen wies die Phagozytosekinetik der Liposomen aus PG:PS:Cholesterol (1,08:1:0,25; molares Verhältnis) keinen signifikanten Unterschied zu den Phagozytosekinetiken der PG:PS:Cholesterol-Liposomen (1,08:1:0,25; molares Verhältnis) mit inkorporiertem Lactosylceramid bzw. *M. fermentans*-Lipid auf (Abb. 10). Beginnend mit ca. 2 % aufgenommener Liposomen nach einer Stunde, stieg die Phagozytoserate der unterschiedlich zusammengesetzten Liposomen bis zum Zeitpunkt von 24 Stunden linear an. Nach 48 Stunden waren annähernd 18 % der angebotenen Liposomen von den Peritonealmakrophagen phagozytiert.

Entsprechend der Vorversuche unter 3.1.1.2 und 3.1.2.1 wurde ein durch die Liposomenzusammensetzung bedingter unterschiedlich hoch ausfallender Verlust von Liposomen bei der Herstellung und der damit verbundene Einsatz ungleich konzentrierter Liposomensuspensionen im Testsystem vernachlässigt.

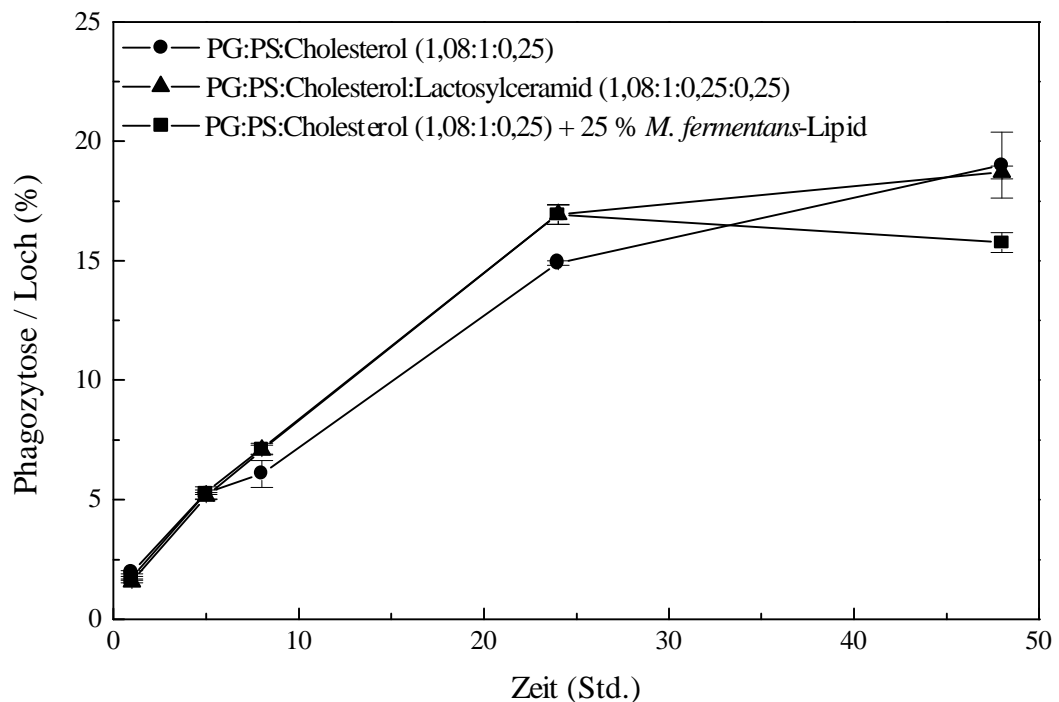


Abbildung 10: Vergleich der Phagozytosekinetik von Liposomen aus PG:PS:Cholesterol mit und ohne Inkorporation von Lactosylceramid oder *M. fermentans*-Lipid. Adhärente Peritonealmakrophagen aus C3H/HeJ-Mäusen wurden mit [3 H]-Cholesterol markierten Liposomen (PG:PS:Cholesterol, 1,08:1:0,25; molares Verhältnis) (ca. 3 μ g Lipid/Loch) in 96-Loch-Mikrotiterplatten inkubiert. In den Kontrollansätzen fehlten die Zellen. Zur angegebenen Zeit wurden die nichtphagozytierten Liposomen abgewaschen und die Vertiefungen der Mikrotiterplatten mit NaOH (0,1 N) gespült. Die Radioaktivität der NaOH-Lösungen wurde im Szintillationszähler bestimmt. Die Meßdaten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus jeweils drei Parallelkulturen. Die Mittelwerte der Kontrollen (Vertiefungen ohne Zellen) wurden subtrahiert.

3.1.3 Der Vergleich der *in vitro* und *in vivo* Aktivität von Liposomen und Mykoplasmen

Für weiterführende *in vitro* und *in vivo* Versuche wurden Liposomen aus PG:PS:Cholesterol (1,08:1:0,25; molares Verhältnis) ausgewählt. Diese inkorporierten MALP-2 unter den gegebenen Herstellungsbedingungen mit einer höheren Effizienz als Liposomen anderer Zusammensetzungen. Da die zusätzliche Inkorporation von Substanzen, die die Wechselwirkungen zwischen Makrophagen und Liposomen steigern sollten, ohne signifikante Wirkung blieb, wurde auf diese verzichtet.

Eine stabile Inkorporation von MALP-2 in die Vesikelmembran wurde durch die gemeinsame Sedimentation von MALP-2 (als % Makrophagen stimulierende Aktivität, MSA) und Liposomen (als % Phospholipid) nachgewiesen. Die Bestimmung der Lipidkonzentration von Liposomensuspensionen erfolgte mit Hilfe einer Phosphatbestimmung [107]. Da die verwendeten Phospholipide jeweils ein Mol Phosphor pro Mol Phospholipid enthielten, konnte von dem gemessenen Phosphorgehalt direkt auf die Phospholipidkonzentration der Liposomensuspension

geschlossen werden. Die Konzentration von inkorporiertem Cholesterol wurde prozentual hinzuaddiert. Parallel zum Phospholipidgehalt wurde die Makrophagen stimulierende Aktivität der verwendeten Liposomen, inklusive die der Waschüberstände, bestimmt (Tab. 3).

| Fraktion | % MSA (U) | % Phospholipid (μmol Phosphat) |
|--------------------------|----------------------|--|
| 1. Waschüberstand | 2,3 | 7,9 |
| 2. Waschüberstand | 2,3 | 4,5 |
| 3. Waschüberstand | 1,1 | 3,4 |
| Liposomensediment | 87,5 | 83,9 |
| Summe | 93,2 | 99,7 |

Tabelle 3: Die Effizienz der MALP-2-Inkorporation in Liposomen aus PG:PS:Cholesterol (1,08:1:0,25; molares Verhältnis).

Hinsichtlich der Ausbeute gewaschener Liposomen kam es bei unterschiedlichen Chargen hergestellter PG:PS:Cholesterol-Liposomen mit ca. 40 - 80 % Phospholipid pro Ansatz zu starken Variationen. Eine geringe Ausbeute des Endproduktes war mit einer entsprechend hohen Phospholipidkonzentration in den Waschüberständen verbunden. Worauf diese Unterschiede zurückzuführen waren, wurde nicht ermittelt. Signifikante Unterschiede in bezug auf Form und Größe der hergestellten Liposomen konnten lichtmikroskopisch nicht ausgemacht werden.

3.1.3.1 Die *in vitro* Aktivität von MALP-2-haltigen Liposomen entsprach der hitzegetöteter Mykoplasmen

Für den Vergleich der Makrophagen stimulierenden Aktivität von Liposomen-inkorporiertem MALP-2 und hitzegetöteten Mykoplasmen im NO-Test wurde die Lipidkonzentration als Bezugsgröße gewählt. Um die Lipidkonzentration von Mykoplasmen bestimmen zu können, wurde sowohl der prozentuale Protein- als auch der prozentuale Lipidanteil einer Mykoplasmen-suspension ermittelt. Dieser lag für Proteine bei ca. 60 %, für Lipide bei ca. 38 % des Trockengewichts. Mit Hilfe der schnell und einfach durchzuführenden Proteinbestimmung nach Lowry [106] konnte auf diesem Weg der Lipidgehalt verschiedener Mykoplasmen-suspension rechnerisch bestimmt werden. Die Ermittlung der Lipidkonzentration einer Liposomensuspension erfolgte durch die Bestimmung des darin enthaltenen Phosphors.

Optimal solubilisiert in OG ist die Makrophagen stimulierende Aktivität von MALP-2 am höchsten [127]. Die natürliche Einbettung in die mykoplasmale Zytoplasmamembran hat ebenso wie die Inkorporation in eine synthetische Liposomenmembran eine reduzierte Stimulationsfähigkeit zur Folge (siehe 3.1.1.1). Um zu untersuchen, ob der Charakter der umgebenden Membran für die Makrophagen stimulierende Aktivität von MALP-2 von Bedeutung ist, wurde die *in vitro* Aktivität von MALP-2-haltigen Liposomen und hitzegetöteten Mykoplasmen im NO-Test verglichen (Abb. 11). Der Gehalt an Makrophagen stimulierender Aktivität lag für Liposomen bei 7000 kU/mg Lipid, für Mykoplasmen bei 1000 kU/mg Lipid. Halbmaximale NO-Freisetzung konnte durch 10 ng Mykoplasma-Lipid mit der darin enthaltenen Makrophagen stimulierenden Aktivität von 10 U bzw. durch 2 ng Liposomen mit der Makrophagen stimulierenden Aktivität von 14 U induziert werden.

Dieser Versuch zeigte, daß Liposomen-inkorporiertes MALP-2 genauso aktiv war wie MALP-2 in seiner natürlichen Umgebung, der mykoplasmalen Zytoplasmamembran. Ein Einfluß der MALP-2 umgebenden Membran auf die Makrophagen stimulierende Aktivität dieses Lipopeptids konnte somit ausgeschlossen werden.

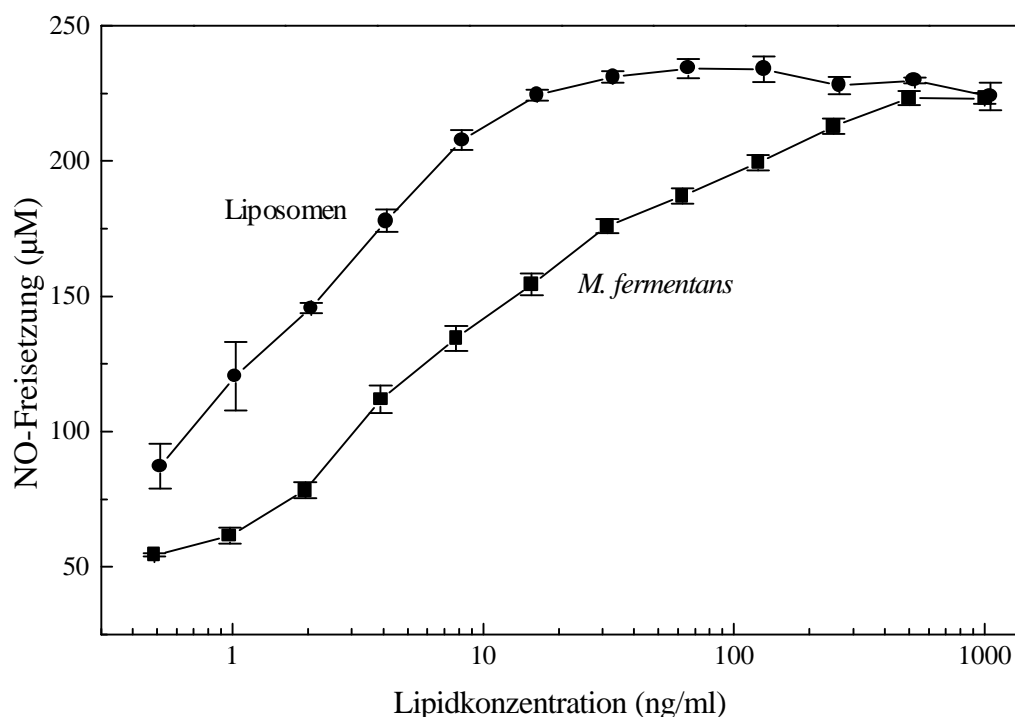


Abbildung 11: Vergleich der NO-Freisetzung muriner Peritonealmakrophagen nach Stimulation mit *M. fermentans* und Liposomen. MALP-2-haltige Liposomen aus PG:PS:Cholesterol (1,08:1:0,25; molares Verhältnis) (mit einer MSA von 7000 kU/mg Lipid) und hitzegetötete *M. fermentans*, Klon II-29/1 (mit einer MSA von 1000 kU/mg Lipid) wurden in Kulturmedium vorverdünnt, in einer 1:2-Verdünnungsreihe ausstitriert und zusammen mit 60 U/ml IFN- γ und PEC aus C3H/HeJ-Mäusen (1×10^5 Zellen/Loch) bei 37 °C und 7,5 % CO₂ inkubiert. Die Bestimmung von NO erfolgte nach 45 Stunden. Die Meßdaten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus jeweils drei Parallelkulturen.

3.1.3.2 Hitzegetötete Mykoplasmen wurden schneller phagozytiert als Liposomen

Die Makrophagen stimulierende Aktivität von MALP-2 war, das hatte der NO-Test gezeigt (siehe 3.1.3.1), von der umgebenden Membran unabhängig. Mit Hilfe radioaktiv markierter Liposomen und Mykoplasmen wurde jedoch deutlich, daß die Phagozytosekinetik der beiden Vesikel starke Unterschiede aufwies (Abb. 12). So wurden Mykoplasmen in den ersten sechs Inkubationsstunden schneller von den Peritonealmakrophagen aufgenommen als Liposomen. Im Anschluß an diese sechs Stunden nahm die aus Mykoplasmen stammende Radioaktivität in den Makrophagen dann jedoch deutlich ab. Diese Abnahme war vermutlich eher auf den Abbau von ^3H -markierter mykoplasmalearer DNA und einer sich daran anschließenden Freisetzung niedermolekularer Radioaktivität ins Medium zurückzuführen, als auf eine reduzierte Phagozytose der Mykoplasmen. Die aus Liposomen stammende Radioaktivität nahm im Gegensatz dazu auch nach sechs Stunden noch deutlich zu und blieb nach zwölf Stunden annähernd konstant. Vermutlich wird das in der Liposomenmembran inkorporierte ^3H -Cholesterol nach der Phagozytose der Liposomen von den Makrophagen in die eigene Zytoplasmamembran eingebaut. Eine Abnahme der Radioaktivität im untersuchten Zeitraum fand daher nicht statt.

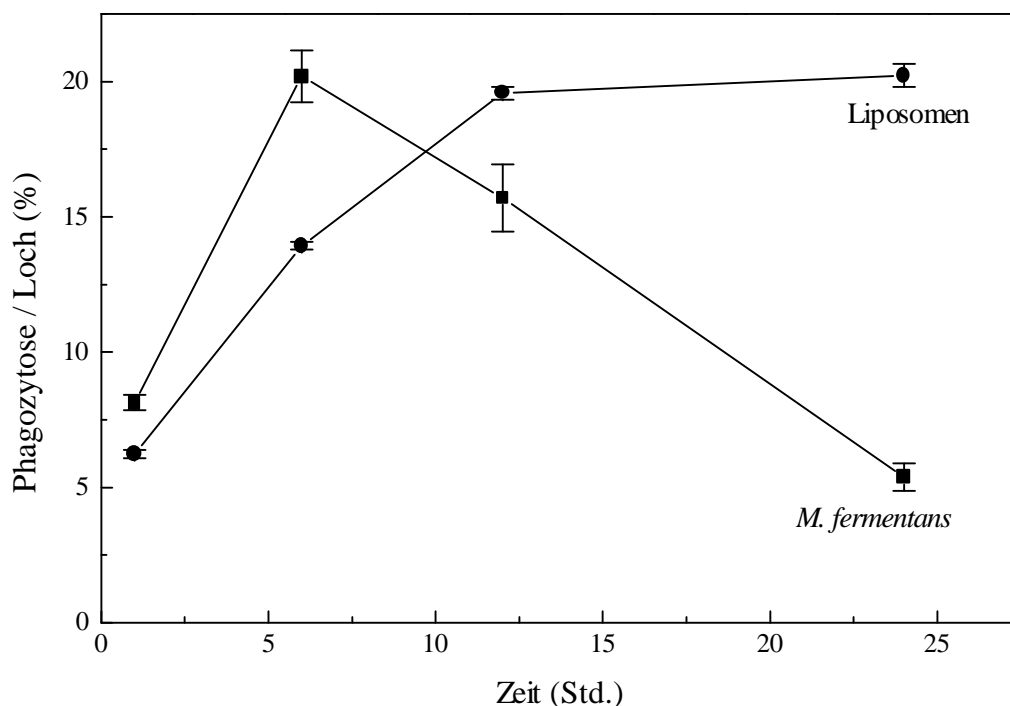


Abbildung 12: Kinetik der Phagozytose von Liposomen und Mykoplasmen durch murine Peritonealmakrophagen. Adhärenzte Peritonealmakrophagen aus C3H/HeJ-Mäusen wurden mit identischen Lipidkonzentrationen [^3H]-Cholesterol markierter Liposomen (PG:PS:Cholesterol, 1,08:1:0,25; molares Verhältnis) oder [^3H -methyl]-Thymidin markierter, hitzegetöteter *M. fermentans*, Klon II-29/1 (jeweils 2 μg Lipid pro Vertiefung) in 96-Loch-Mikrotiterplatten inkubiert. In den Kontrollansätzen fehlten die Zellen. Zur angegebenen Zeit wurden die nichtphagozytierten Partikel abgewaschen und die Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit NaOH (0,1 N) gespült. Die Radioaktivität der NaOH-Lösungen wurde im Szintillationszähler bestimmt.

Die Meßdaten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus jeweils drei Parallelkulturen. Die Mittelwerte der Kontrollen (Vertiefungen ohne Zellen) wurden subtrahiert.

3.1.3.3 Die iv-Injektion hitzegetöteter Mykoplasmen sowie Liposomen-inkorporiertem und gelöstem MALP-2 induzierte im Kaninchen eine Erhöhung der Körpertemperatur

Nachdem *in vitro* nachgewiesen worden war, daß die umgebende Membran auf die Makrophagen stimulierende Aktivität von MALP-2 keinen Einfluß hatte (siehe 3.1.3.1), sollte ein Fiebertest im Kaninchen Auskunft darüber geben, ob Gleiches auch für die *in vivo* Situation galt. Zu diesem Zweck wurden hitzegetötete Mykoplasmen sowie MALP-2-haltige Liposomen und Kontroll-Liposomen in jeweils drei Kaninchen injiziert und die Auswirkungen auf die Körpertemperatur gemessen und miteinander verglichen. Die Injektion von hitzegetöteten *M. fermentans*, Klon II-29/1 (0,75 mg Protein mit einer MSA von 300 kU) führte zu einer durchschnittlichen Temperaturerhöhung von $0,8 \pm 0,1$ °C. Durch die Applikation des *in vitro* deutlich geringer aktiven *M. fermentans* Klon II-23 (0,75 mg Protein mit einer MSA von 60 kU) wurde mit $0,9 \pm 0,3$ °C eine in der gleichen Größenordnung liegende Temperaturerhöhung induziert. Nach Injektion von MALP-2-haltigen Liposomen (mit einer MSA von 750 kU) fiel die Erhöhung der Körpertemperatur im Kaninchen mit $0,5 \pm 0,1$ °C deutlich geringer aus, während nach Injektion gleicher Lipidkonzentrationen an Kontroll-Liposomen mit $0,1 \pm 0,06$ °C überhaupt keine Temperaturerhöhung nachzuweisen war. Durch die intravenöse Applikation von gelöstem MALP-2 (mit einer MSA von 3000 kU) konnte eine Temperaturerhöhung von $0,7 \pm 0,4$ °C induziert werden (Daten nicht gezeigt).

Ebenso wie die Fieberversuche unter 3.1.1.3 wurden auch diese Versuche freundlicherweise von Herrn Dr. H. Ronneberger (Hoechst Marion Roussel, Marburg) durchgeführt.

Der Fiebertest im Kaninchen zeigte, daß durch die Injektion des mykoplasmaalen Lipopetids MALP-2, gelöst oder in Liposomen inkorporiert, eine pyrogene Reaktion hervorgerufen werden konnte. *In vivo* verfügten hitzegetötete Mykoplasmen jedoch, trotz eines deutlich geringeren Gehalts an Makrophagen stimulierender Aktivität, über ein höheres fiebererzeugendes Potential als MALP-2 (gelöst oder Liposomen-inkorporiert). Dieses Verhalten stand im Widerspruch zu dem *in vitro* Ergebnis, daß hitzegetötete Mykoplasmen und Liposomen bei gleichem MALP-2-Gehalt über eine Makrophagen stimulierende Aktivität in gleicher Größenordnung verfügen (siehe 3.1.3.1). Eine Diskrepanz zwischen *in vitro* und *in vivo* Ergebnissen lag auch bei dem Vergleich der beiden hitzegetöteten *M. fermentans* Klone mit deutlich unterschiedlicher Makrophagen stimulierender Aktivität vor: Während dieser Unterschied *in vitro* mit Hilfe des NO-Tests deutlich sichtbar gemacht werden konnte (nicht gezeigt), war *in vivo* eine Abhängigkeit der induzierten Temperaturerhöhung von der Makrophagen stimulierenden Aktivität der beiden Klone nicht zu

beobachten.

Die Diskrepanz zwischen *in vitro* und *in vivo* Versuchen könnte darauf zurückzuführen sein, daß Mykoplasmen noch andere pyrogen wirkende Substanzen enthalten. Zu diesen zählen möglicherweise auch Nukleinsäuren. So wiesen Sparwasser et al. nach ip-Injektion von 10 nMol eines synthetischen Oligonukleotids in Mäuse eine erhöhte Freisetzung des endogenen Pyrogens TNF- α im Serum nach [169]. Schöbitz et al. konnten nach intrazerebroventrikularer Applikation von Oligonukleotiden in Ratten (5 bis 50 μ g pro Tier) eine Erhöhung der Körpertemperatur induzieren [160].

Die Fiebersversuche im Kaninchen stellten ein geeignetes System dar, um erste Eindrücke von der *in vivo* Aktivität hitzegetöteter Mykoplasmen sowie Liposomen-inkorporiertem und gelöstem MALP-2 zu erhalten. Da diese Versuche an der GBF selbst nicht durchgeführt werden konnten, das *in vivo*-Verhalten von MALP-2 sowohl in gelöster als auch in partikulärer Form jedoch Gegenstand weiterer Untersuchungen sein sollte, wurde aus versuchstechnischen Gründen mit der intraperitonealen Injektion der verschiedenen MALP-2-Präparationen in Mäuse ein anderes, durch verschiedene Arbeitsgruppen bereits etabliertes *in vivo*-Testsystem eingeführt [5, 54, 60, 157].

3.2 Das mykoplasmale Lipopeptid MALP-2 als potenter Stimulator der Zytokin- und Chemokinsynthese *in vitro* und *in vivo*

In vitro ist das mykoplasmale Lipopeptid MALP-2 in der Lage, Makrophagen zur Freisetzung verschiedener Mediatoren, wie z. B. IL-1, IL-6, TNF- α und NO, zu stimulieren [126, 127, 154]. Wie mit Hilfe des synthetischen Lipopeptid-Analogons N-palmitoyl-S-(2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl)-(R)-cysteinyl-alanyl-glycine (Pam₃Cys-Ala-Gly) gezeigt werden konnte, verfügen auch Lipopeptide gram-negativer Bakterien über die Fähigkeit der Makrophagenstimulierung *in vitro* [59]. *In vivo* ist eine Freisetzung der inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 und IL-6 nach ip-Injektion von Pam₃Cys-Ala-Gly in NMRI-Mäuse jedoch nicht nachzuweisen [60].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die *in vivo* Aktivität von MALP-2, die im Gegensatz zu der *in vitro* Aktivität weitgehend unbekannt war, sowie dessen Rolle beim Mykoplasmen-induzierten Entzündungsvorgang untersucht werden. Zum Nachweis einer möglichen *in vivo* Aktivität wurde neben der *in vivo* Freisetzung von Zytokinen auch eine durch MALP-2 induzierte und durch Leukozyteninfiltration charakterisierte zelluläre Wirtsantwort herangezogen.

Eine zelluläre Wirtsreaktion, die durch die Infiltration von Leukozyten am Entzündungsort gekennzeichnet ist, kann sowohl durch eine natürliche [147] als auch durch eine experimentell hervorgerufene [28, 70, 101, 180] Infektion mit Mykoplasmen induziert werden. Über die mykoplasmaalen Komponenten, die diese Leukozyteninfiltration auszulösen vermögen, sowie über die daran beteiligten Mechanismen, ist bisher jedoch nur wenig bekannt. Lediglich von Ross et al. wurde *in vitro* die chemotaktische Aktivität einer Membranprotein-Präparation aus *M. pulmonis* gegenüber B-Lymphozyten nachgewiesen [149].

3.2.1 Vorversuche zum *in vivo* Verhalten von MALP-2

Die Vorversuche dienten in erster Linie dazu, die Anzahl der Versuchstiere klein zu halten. Aus diesem Grund wurde vorab mit möglichst wenigen Tieren untersucht, ob und zu welchem Zeitpunkt nach ip-Injektion hitzegetöteter *M. fermentans* eine zelluläre Wirtsantwort in Form infiltrierter Granulozyten nachzuweisen war. Die ip-Injektion von Liposomen-inkorporiertem und gelöstem MALP-2 diente dem Nachweis einer generellen Beteiligung von MALP-2 an diesen inflammatorischen Effekten.

3.2.1.1 Die Auswahl eines geeigneten Mausstammes

Humane Monozyten lassen sich, ebenso wie murine Peritonealmakrophagen, mit einer aus *M. fermentans* infizierten HL60-Zellen hergestellten Präparation stimulieren [141]. Das Ausmaß dieser Reaktion zeigte eine Abhängigkeit vom individuellen Monozytenspender. Unterschieden wurden sogenannte “low-“ und “high-responder” (G. Jahns und P. F. Mühlradt, unveröffentlicht). Auch bei Mäusen konnte *in vitro* eine vom verwendeten Mausstamm abhängige Reaktionsfähigkeit auf die Stimulation mit mykoplasmaalen Lipopeptiden im NO-Test nachgewiesen werden: So war mit humanem Serum im Kulturmedium, anstelle von fetalem Kälberserum, die für halbmaximale NO-Freisetzung benötigte Konzentration an MALP-H bei Verwendung von Peritonealmakrophagen aus BALB/c-Mäusen zehnmal geringer als z. B. bei Verwendung von Peritonealmakrophagen aus C3H/HeJ- oder NMRI-Mäusen. Bei MALP-H handelt es sich um ein Lipopeptid aus *M. hyorhina*. Sowohl in der Struktur als auch in der Fähigkeit zur Makrophagenstimulation ähnelt es MALP-2 aus *M. fermentans* [129]. Da es, im Gegensatz zu MALP-2, zum Zeitpunkt dieser Vorversuche in ausreichender Menge zur Verfügung stand, konnte es als ein typischer Vertreter Makrophagen stimulierender, mykoplasmaaler Lipopeptide im NO-Stimulationstest eingesetzt werden. Der Einsatz von humanem Serum war notwendig geworden, weil sich sowohl die Zellen von BALB/c- als auch von NMRI-Mäusen durch das mit geringen LPS-Konzentrationen kontaminierte Kälberserum stimulieren ließen und eine aussagekräftige Bewertung des NO-Tests nicht möglich machten. Die für halbmaximale NO-Freisetzung durch Peritonealmakrophagen aus NMRI-Mäusen benötigte Konzentration an MALP-H entsprach der von C3H/HeJ-Mäusen (nicht gezeigt).

Aufgrund der hohen Sensitivität gegenüber MALP-H schied der Inzuchtstamm BALB/c für die vorgesehenen *in vivo* Versuche als untypischer “high-responder” aus. Als am ehesten geeignet wurden NMRI-Mäuse ausgewählt, da ihre Reaktion auf die Stimulation mit MALP-H der Reaktion von routinemäßig im NO-Test eingesetzten C3H/HeJ-Mäusen entsprach und sie somit weder zu den “low-“ noch zu den “high-responder-Mäusen” gezählt werden konnten. Ein weiteres Auswahlkriterium war, daß es sich bei NMRI-Mäusen um Auszuchtmäuse handelt. Auf diese Weise konnte ausgeschlossen werden, daß die in dieser Arbeit beobachteten Effekte möglicher-

weise atypisch waren, weil sie ausschließlich in einem zufällig ausgewählten Inzuchtstamm auftreten.

3.2.1.2 Vorversuch zur Mykoplasmen-induzierten Granulozyteninfiltration

Wie eingangs bereits erwähnt, ist sowohl die natürliche als auch die experimentell hervorgerufene Infektion mit pathogenen Mykoplasmen durch eine Infiltration von Leukozyten zum Infektionsherd gekennzeichnet.

Eine entsprechende Wirtsantwort konnte in dieser Arbeit durch die ip-Injektion hitzegetöteter Mykoplasmen ausgelöst werden. Hitzegetötete Mykoplasmen wurden lebenden vorgezogen, da auf diese Weise unkontrollierbare Faktoren, wie z. B. die Teilungsrate der Mykoplasmen im Wirtsorganismus, unberücksichtigt bleiben konnten. Abb. 13 zeigt eine Kinetik der Infiltration polymorphkerniger Granulozyten nach ip-Injektion hitzegetöteter *M. fermentans*, Klon II-29/1 in NMRI-Mäuse. Bereits 6 Stunden nach Injektion setzte sich die Gesamtzellzahl im Peritonealraum zu einem Viertel aus Granulozyten zusammen. Nach 48 Stunden war mit 37 % ein Maximum erreicht. Die Injektion physiologischer Kochsalzlösung hatte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte einen Anstieg der peritonealen Granulozytenkonzentration zur Folge.

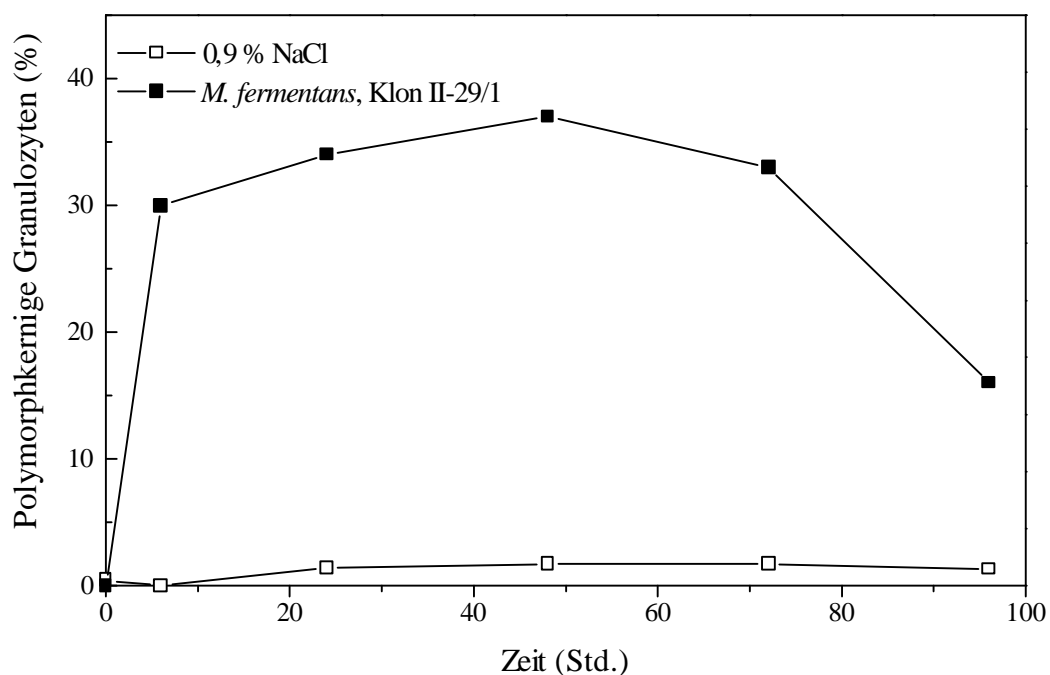


Abbildung 13: Kinetik der Infiltration polymorphkerniger Granulozyten nach Injektion hitzegetöteter Mykoplasmen. Nach ip-Injektion von *M. fermentans*, Klon II-29/1 (0,6 mg Protein mit einer MSA von 250 kU) bzw. 0,9 %iger NaCl wurden die NMRI-Mäuse zu den angegebenen Zeiten getötet und die Peritonealzellen entnommen. Das Auszählen der Granulozyten erfolgte nach Zentrifugation der PEC auf Objektträger und anschließender Wright-Färbung.

Die Konzentration der infiltrierten Granulozyten wurde jeweils durch das Auszählen der Zellen nach Zentrifugation der Peritonealzellen auf Objektträger und einer sich anschließenden Wright-Färbung mikroskopisch ermittelt. Neutrophile Granulozyten lassen sich hierbei anhand des beinahe durchsichtigen Zytoplasmas und des unregelmäßig geformten, rotviolett gefärbten Zellkerns identifizieren. Demgegenüber ist das Zytoplasma eosinophiler Granulozyten ziegelrot bis rotbraun. Basophile Granulozyten weisen nach Wright-Färbung ein dunkelviolettes bis schwarzes Zytoplasma auf, wurden jedoch im Peritonealraum der behandelten Mäuse nicht nachgewiesen. Das Zytoplasma von Lymphozyten nimmt infolge der Wright-Färbung eine hellblaue Farbe an, das der Monozyten und Makrophagen eine graublaue [121].

Der zum Fotografieren verwendete Film gab diese Farben leider nicht optimal wieder (siehe Abb. 14 sowie auch Abb. 21).

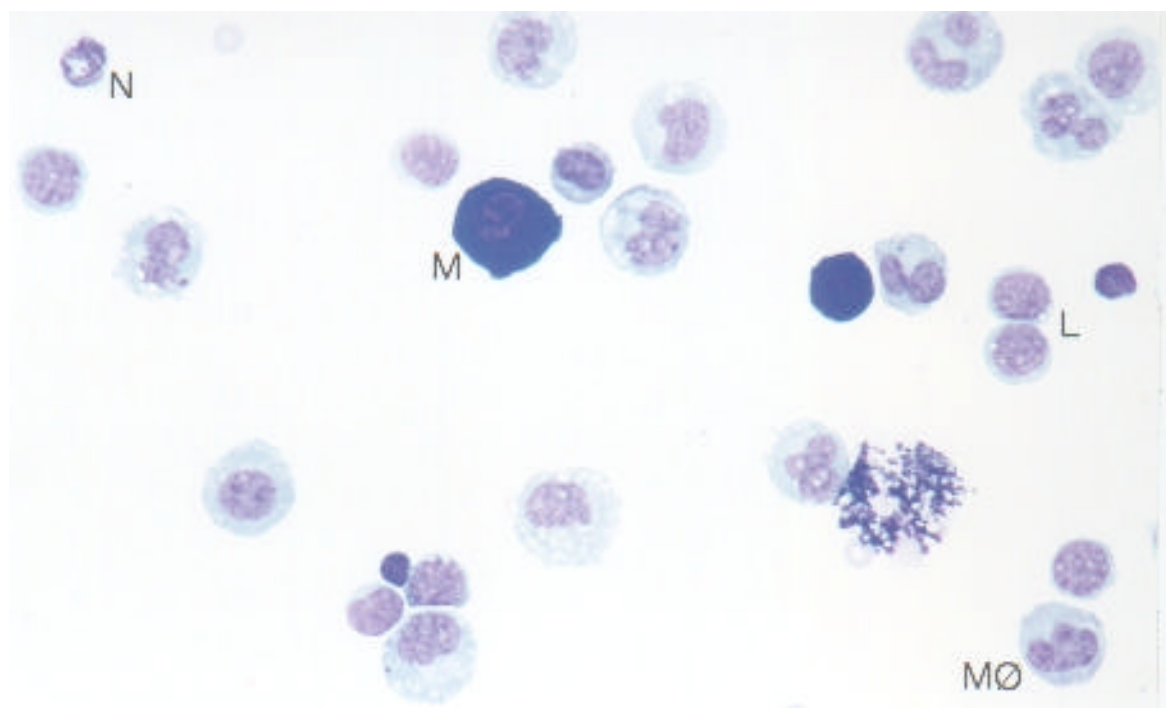


Abbildung 14: Lichtmikroskopische Aufnahme von murinen Peritonealzellen. Anfärbung nach Wright. L = Lymphozyt, M = Mastzelle, MØ = Makrophage, N = Neutrophiler. Vergrößerung: 320fach.

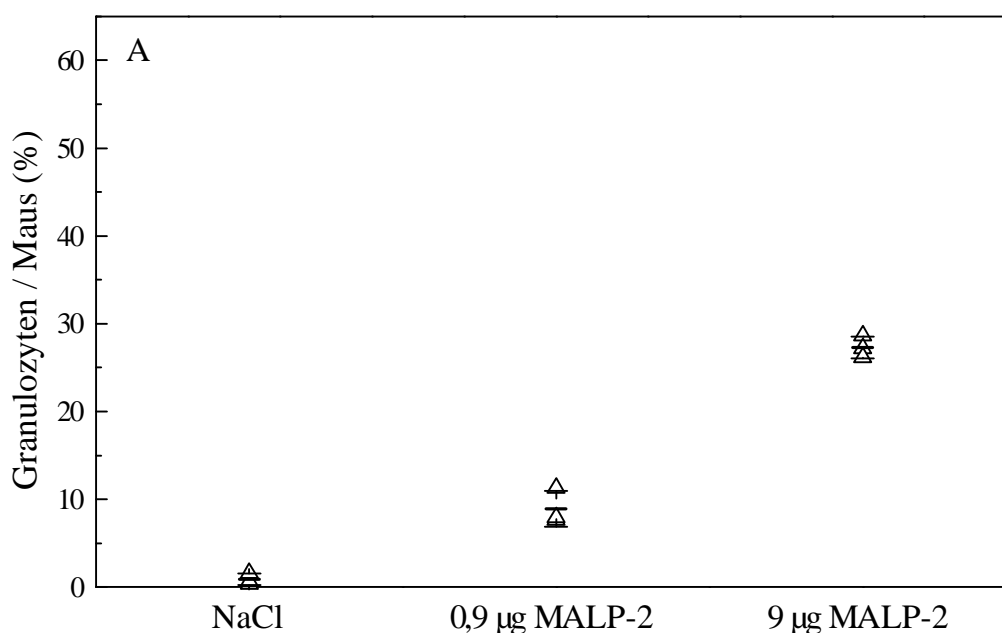
Parallel zur mikroskopischen Auszählung der Granulozyten erfolgte anfangs, mit Hilfe des Granulozyten-spezifischen monoklonalen Antikörpers “anti-Gr1”, die Bestimmung der Granulozytenkonzentration mittels FACS-Analyse. Die durch den Einsatz dieses Antikörpers und der sich anschließenden FACS-Analyse ermittelte Granulozytenkonzentration lag häufig um einige Prozentpunkte unterhalb der Granulozytenzahl, die lichtmikroskopisch ausgezählt werden konnte. Diese Differenz war vermutlich darauf zurückzuführen, daß die verschiedenen Granulozyten das Antigen, gegen das der monoklonale Antikörper gerichtet ist, unterschiedlich stark auf ihrer Oberfläche exprimierten. So zeigt die Mehrzahl neutrophiler Granulozyten eine hohe bis mittlere Expressionsrate, während Eosinophile das Antigen nur schwach bzw. gar nicht exprimieren [66]. Ein Großteil eosinophiler Granulozyten konnte somit zwar mikroskopisch, nicht aber mittels

FACS-Analyse erfaßt werden. Die Quantifizierung infiltrierter Granulozyten nach ip-Injektion verschiedener MALP-2-Präparationen bzw. Kontrollen (Kontroll-Liposomen und NaCl) wurde aus diesem Grund mikroskopisch vorgenommen.

3.2.1.3 Vorversuch zur MALP-2-induzierten Granulozyteninfiltration

Nachdem die Infiltration von Leukozyten nach ip-Injektion hitzegetöteter Mykoplasmen in NMRI-Mäuse nachgewiesen war, wurde untersucht, ob auch MALP-2 als Makrophagenstimulator und Bestandteil der mykoplasmaalen Zytoplasmamembran die Fähigkeit besitzt, eine zelluläre und durch die Infiltration von Granulozyten gekennzeichnete Wirtsantwort zu induzieren. Die Granulozytenkonzentration nach ip-Injektion von gelöstem bzw. Liposomen-inkorporiertem MALP-2 wurde jeweils zum Zeitpunkt des Maximums, 48 Stunden nach Injektion (siehe 3.2.1.2), bestimmt. In beiden Fällen konnte eine Infiltration polymorphkerniger Granulozyten beobachtet werden (Abb. 15 A und 15 B).

Nach ip-Injektion von jeweils 0,9 µg gelöstem MALP-2 (mit einer MSA von 100 kU) in drei NMRI-Mäuse lag die Anzahl der Granulozyten im Peritonealraum behandelter Tiere bei $8,9 \pm 2$ % (Abb. 15 A). Die Injektion von jeweils 9 µg (mit einer MSA von 1000 kU) erhöhte diese auf $27,3 \pm 1,2$ %. Nach Injektion von 0,9 µg Liposomen-inkorporiertem MALP-2 lag der durchschnittliche Prozentsatz mit $6,1 \pm 1,3$ % Granulozyten in der gleichen Größenordnung wie nach ip-Injektion von gelöstem MALP-2 (Abb. 15 B). Dagegen machten die Granulozyten nach ip-Injektion von 9 µg Liposomen-inkorporiertem MALP-2 mit $49,6 \pm 10,1$ % pro Maus bereits die Hälfte aller im Peritonealraum befindlichen Leukozyten aus. Die ip-Injektion von Kontroll-Liposomen ohne inkorporiertes MALP-2 führte zu einer durchschnittlichen Granulozytenkonzentration von $7,4 \pm 0,9$ %.



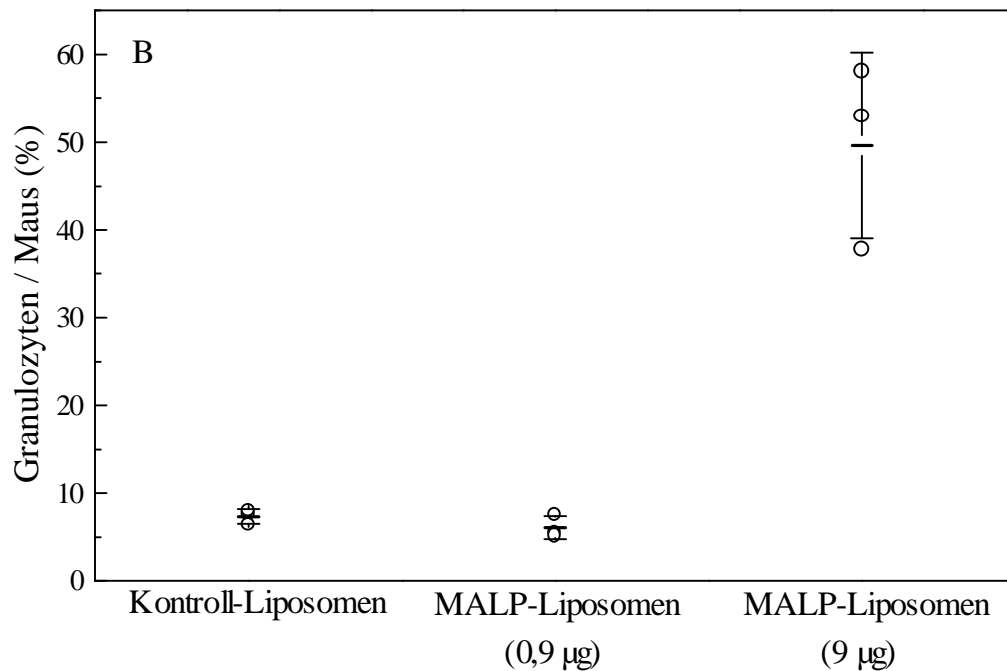


Abbildung 15: Einfluß der injizierten Konzentration von gelöstem und Liposomen-inkorporiertem MALP-2 auf das Ausmaß der intraperitonealen Granulozyteninfiltration. Gruppen von jeweils drei NMRI-Mäusen wurden 48 Stunden nach ip-Injektion von je 200 µl NaCl, gelöstem MALP-2 (0,9 und 9 µg) (A), Kontroll-Liposomen bzw. Liposomen-inkorporiertem MALP-2 (0,9 und 9 µg) (B) getötet. Die entnommenen Peritonealzellen wurden auf Objektträger zentrifugiert und die Konzentration der Granulozyten nach Wright-Färbung durch Auszählen ermittelt.

3.2.2 Die durch MALP-2 induzierte *in vitro* Synthese von Zytokinen und Chemokinen

Zu den früh induzierten, nichtadaptiven Reaktionen auf eine Infektion gehört die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen, u. a. durch aktivierte Makrophagen. Chemokine wirken in erster Linie als Lockstoffe für phagozytierende Zellen. Ihre Synthese kann durch Viren und gewebescheidende Agenzien, aber auch durch eine Vielzahl bakterieller Bestandteile und Produkte, z. B. durch Exotoxine und LPS, induziert werden [zusammengefaßt in 83].

Auch im Verlauf einer Infektion mit pathogenen Mykoplasmen findet Chemotaxis statt. Diese ist oftmals durch eine frühe Infiltration polymorphkerniger Granulozyten und eine späte Infiltration von Makrophagen und Lymphozyten gekennzeichnet [101]. Für die frühe Granulozyteninfiltration sind die sogenannten “ α -Chemokine” oder “C-X-C-Chemokine” verantwortlich, deren chemotaktisches Potential sich in erster Linie auf neutrophile Granulozyten beschränkt. Zu dieser Gruppe zählt u. a. MIP-2. Die spätere Infiltration von Makrophagen und Lymphozyten wird v. a. durch die “ β -Chemokine” oder “C-C-Chemokine” induziert. Vertreter der β -Chemokine sind u. a. MIP-1 α und MCP-1 (siehe auch 1.4.3).

Die bei einer Infektion mit Mykoplasmen zu beobachtende Infiltration von Granulozyten konnte,

das hatten die Vorversuche gezeigt, auch durch die ip-Injektion des Makrophagen stimulierenden Lipopeptids MALP-2 induziert werden (siehe 3.2.1.3). Als denkbar erschien daher, daß MALP-2, ein potenter Stimulator der Zytokinfreisetzung *in vitro* [127], Makrophagen gleichzeitig zur Freisetzung von Chemokinen stimulieren und auf diesem Weg eine Chemotaxis induzieren kann. Zunächst wurde *in vitro* in einem Dosis-Wirkungs-Experiment die grundsätzliche Möglichkeit einer MALP-2-induzierten Chemokinfreisetzung untersucht. Da bei einer Mykoplasmeninfektion neben neutrophilen Granulozyten auch mononukleäre Leukozyten einwandern, wurde sowohl die *in vitro* Freisetzung des α -Chemokins MIP-2 als auch die der β -Chemokine MIP-1 α und MCP-1 untersucht.

3.2.2.1 Die *in vitro* Synthese der Chemokine MCP-1, MIP-1 α und MIP-2

In einem Dosis-Wirkungs-Experiment wurde die Fähigkeit von MALP-2 und LPS, Peritonealmakrophagen zur Freisetzung der Chemokine MCP-1, MIP-1 α und MIP-2 zu stimulieren, miteinander verglichen. LPS kam hierbei die Rolle der Positivkontrolle zu, da die LPS-induzierte Freisetzung dieser drei Chemokine durch stimulierte Makrophagen bereits bekannt war [108, 194, 195]. Die *in vitro* Synthese der Chemokine wurde in separaten Experimenten mit Peritonealmakrophagen aus drei Mäusen durchgeführt; exemplarisch dargestellt ist das mit den Zellen einer Maus erhaltene Ergebnis. Für den Nachweis der Freisetzung verschiedener Chemokine wurden die Peritonealmakrophagen derselben Maus verwendet.

Abb. 16 A-C zeigt, daß es sich bei MALP-2 um einen sehr potenten Stimulator der Chemokinfreisetzung handelte. Bezogen auf pg/ml war die für halbmaximale Freisetzung von MCP-1, MIP-1 α und MIP-2 erforderliche Konzentration von MALP-2 mit ca. 50 pg/ml um eine Zehnerpotenz niedriger als die von LPS (ca. 500 pg/ml). Obwohl die maximale Freisetzung der Chemokine nach Stimulation mit LPS bzw. MALP-2 zwischen den Mäusen variierte, war die für halbmaximale Freisetzung benötigte Konzentration der Stimulatoren vom individuellen Tier weitgehend unabhängig. Unstimulierte Zellen setzten nach sechs Stunden Inkubation 65 pg MIP-1 α /ml, 4,2 ng MIP-2/ml und 170 pg MCP-1/ml frei.

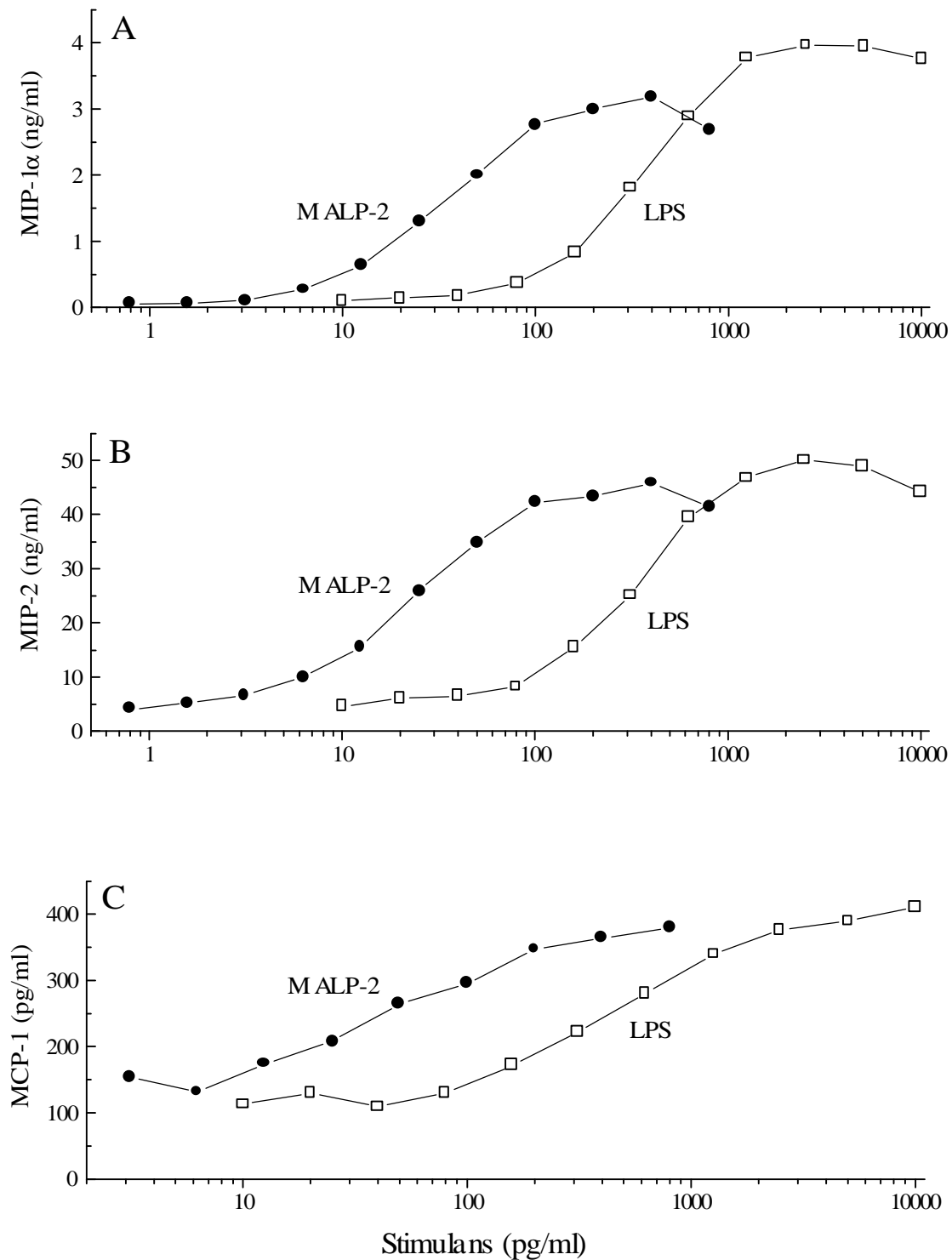
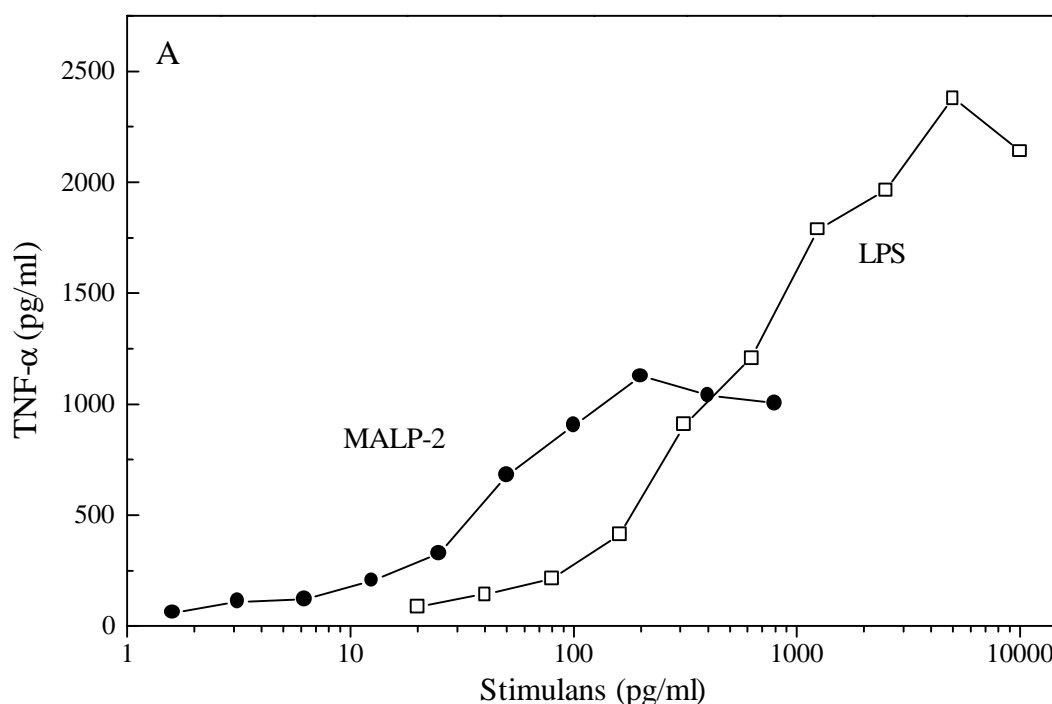


Abbildung 16: Die durch MALP-2 und LPS induzierte *in vitro* Synthese von Chemokinen. PEC von NMRI-Mäusen wurden in 100 µl Kulturmedium pro Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte eingesät (1×10^5 Zellen pro Loch) und 16 Stunden bei 37 °C und 7,5 % CO₂ inkubiert. Nach Abtrennung der nichtadhärenten Zellen wurden die Peritonealmakrophagen mit LPS aus *Salmonella typhimurium* (◻) bzw. MALP-2 (●) in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Zur optimalen Solubilisierung wurde MALP-2 in 25 mM OG vorverdünnt. Für die Bestimmung von MIP-1α (A), MIP-2 (B) und MCP-1 (C) wurden nach 6 Stunden

Aliquots der Kulturüberstände entnommen und bis zur Bestimmung der Chemokine im ELISA bei -20 °C aufbewahrt. Die Daten sind repräsentative Ergebnisse aus einem von drei, mit den Zellen verschiedener Tiere, durchgeführten separaten Experimenten.

3.2.2.2 Die *in vitro* Synthese von TNF- α und IL-6

Um die LPS- bzw. MALP-2-induzierte *in vitro* Freisetzung der Chemokine mit der von TNF- α und IL-6 korrelieren zu können, wurden die beiden proinflammatorischen Zytokine in Parallelkulturen getestet, d. h. für den Nachweis der Chemokine und Zytokine wurden Peritonealzellen derselben Maus verwendet. Die TNF- α -Konzentration wurde, da ein Maximum der *in vitro* Freisetzung nach drei bis vier Stunden erreicht ist [47], nach 3,5 Stunden bestimmt. Der Nachweis von IL-6 im Kulturüberstand erfolgte nach acht Stunden. Zu diesem Zeitpunkt stellen die Peritonealmakrophagen ihre IL-6-Produktion ein [47]. Entsprechend dem Vergleich der *in vitro* Synthese der verschiedenen Chemokine lag die für halbmaximale Freisetzung von TNF- α und IL-6 erforderliche Konzentration an MALP-2 mit ca. 50 pg/ml um eine Zehnerpotenz niedriger als die erforderliche Konzentration an LPS (siehe Abb. 17 A und 17 B). Im Gegensatz dazu war die maximale Konzentration freigesetzter Zytokine nach Stimulation mit LPS deutlich höher als nach Stimulation mit MALP-2. Im Kulturüberstand unstimulierter Zellen konnten 68 pg TNF- α /ml nachgewiesen werden, die Konzentration an freigesetztem IL-6 machte weniger als 3 ng/ml aus.



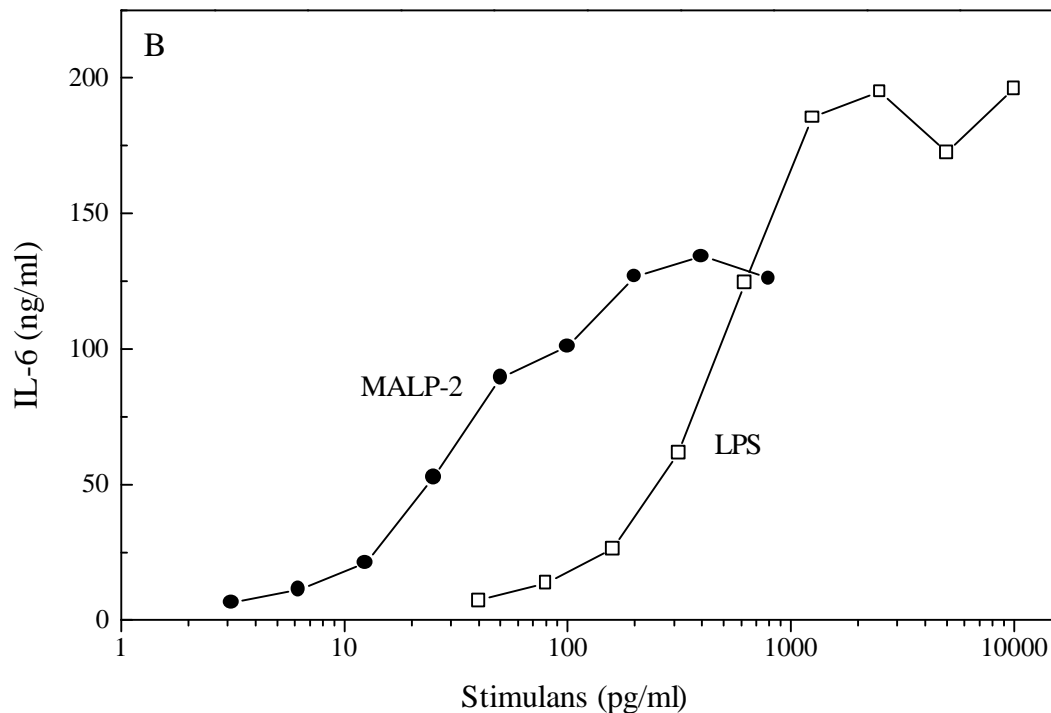


Abbildung 17: Die durch MALP-2 und LPS induzierte *in vitro* Synthese von Zytokinen. Peritonealmakrophagen aus NMRI-Mäusen wurden wie in Abb. 16 gewonnen und mit LPS aus *Salmonella typhimurium* (□) bzw. MALP-2 (●) in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Zur optimalen Solubilisierung wurde MALP-2 in 25 mM OG vorverdünnt. Für die Bestimmung von TNF- α im Bioassay (A) und IL-6 im ELISA (B) wurden nach 3,5 bzw. 8 Stunden Aliquots der Kulturüberstände entnommen und bis zur Bestimmung der Zytokine bei -20 °C aufbewahrt. Die Daten sind repräsentative Ergebnisse aus einem von drei, mit den Zellen verschiedener Tiere, durchgeführten separaten Experimenten.

3.2.2.3 Die *in vitro* Kinetik der Chemokine MCP-1, MIP-1 α und MIP-2

Die Kinetiken der MALP-2 induzierten Freisetzung der Chemokine MCP-1, MIP-1 α und MIP-2 sind in Abb. 18 dargestellt. Erhöhte Konzentrationen von MIP-1 α konnten bereits nach zwei Stunden im Überstand der mit MALP-2 stimulierten Peritonealmakrophagen nachgewiesen werden. Demgegenüber erreichten MIP-2 und MCP-1 erst nach vier Stunden Konzentrationen, die über denen unstimulierter Zellen lagen. Während die Konzentration von MIP-1 α jedoch sechs Stunden nach Stimulation ein Maximum erreichte und dann wieder deutlich abnahm, stieg die Konzentration an freigesetztem MCP-1 und MIP-2 über den gesamten Untersuchungszeitraum von 48 Stunden stetig an. Entsprechend des Dosis-Wirkungs-Experiments (siehe 3.2.2.1) wurde auch die Kinetik von MCP-1, MIP-1 α und MIP-2 in separaten Experimenten mit Peritonealmakrophagen aus drei NMRI-Mäusen durchgeführt. Exemplarisch dargestellt ist das mit den Zellen einer Maus erhaltene Ergebnis.

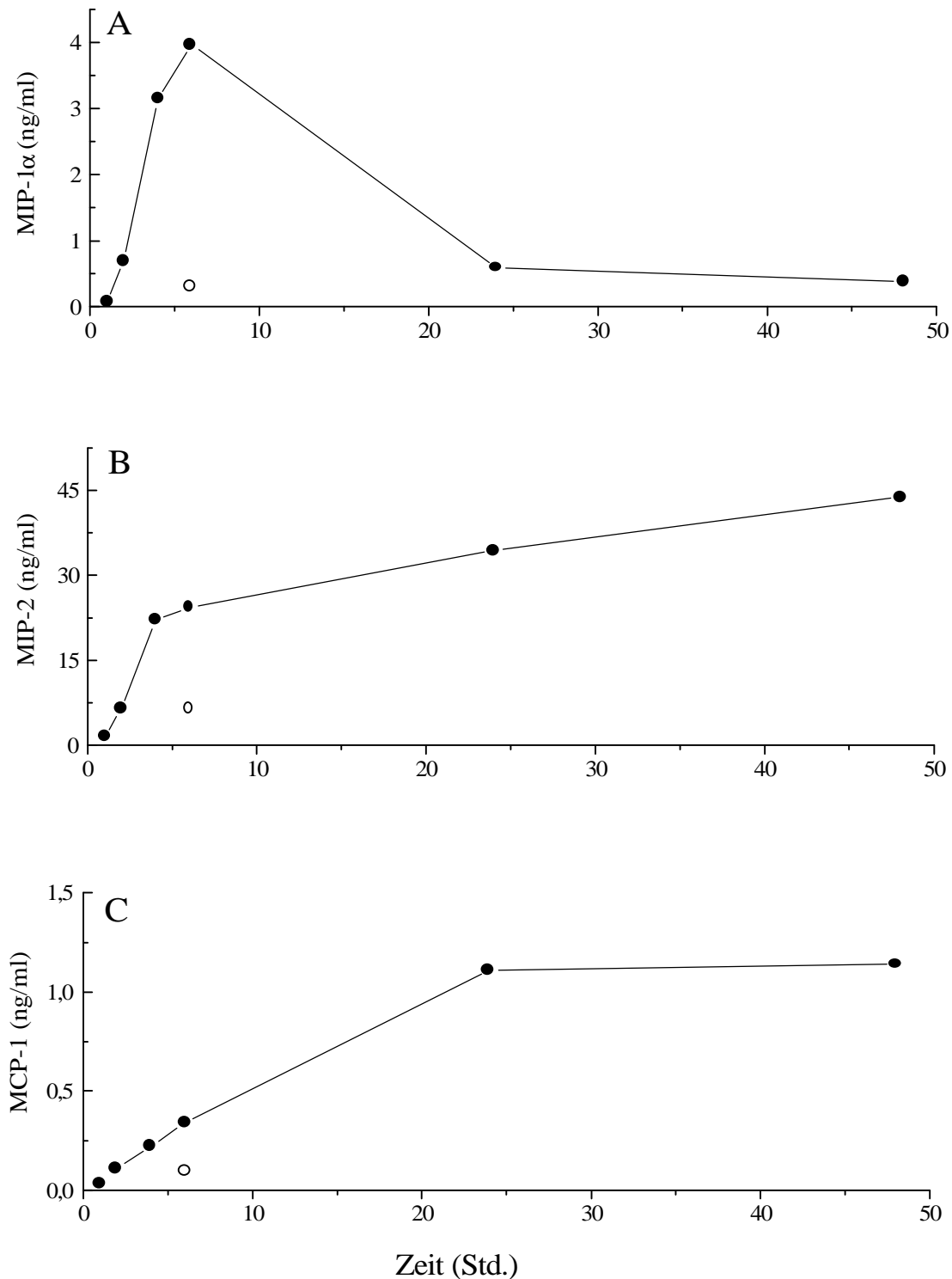


Abbildung 18: *In vitro* Kinetik der MALP-2-induzierten Freisetzung von Chemokinen durch murine Peritonealmakrophagen. Peritonealmakrophagen aus NMRI-Mäusen wurden wie in Abb. 16 gewonnen und in Kulturmedium ohne Zusätze (offene Symbole) oder mit 200 pg MALP-2/ml (geschlossene Symbole) bei 37 °C und 7,5 % CO₂ inkubiert. Zur optimalen Solubilisierung wurde MALP-2 in 25 mM OG vorverdünnt. Zu den angegebenen Zeiten wurden Aliquots der Kulturüberstände entnommen und bis zur Bestimmung von MIP-1 α (A), MIP-2 (B) und MCP-1 (C) im ELISA bei -20 °C aufbewahrt. Die Daten sind repräsentative Ergebnisse aus einem von drei, mit den Zellen verschiedener Tiere, durchgeführten separaten Experimenten.

3.2.3 Die *in vivo* Aktivität des mykoplasmalen Lipopeptids MALP-2

Die Vorversuche hatten gezeigt, daß sowohl durch die ip-Injektion von hitzegetöteten Mykoplasmen als auch durch die ip-Injektion von Liposomen-inkorporiertem und gelöstem MALP-2 eine Infiltration polymorphkerniger Granulozyten in den murinen Peritonealraum induziert werden konnte (siehe 3.2.1.2 und 3.2.1.3). Die Reaktion der individuellen Mäuse auf eine ip-Injektion war hierbei z. T. sehr unterschiedlich. So schwankte der Prozentsatz infiltrierter Granulozyten nach Injektion identischer Konzentrationen an Liposomen-inkorporiertem MALP-2 (9 µg pro Maus) zwischen 37,8 und 58,1 % (siehe Abbildung 15 B). Da konzentrationsabhängige Fehler bzw. Fehler beim Injektionsvorgang weitgehend ausgeschlossen werden konnten, wurden diese Schwankungen als eine natürliche Konsequenz des *in vivo* Versuchssystems betrachtet. Um den durch diese individuellen Schwankungen entstehenden Fehler möglichst klein zu halten, wurden weiterführende Experimente mit mindestens drei, in den meisten Fällen jedoch mit sechs Tieren pro Versuchsansatz durchgeführt. Die Kinetik der Infiltration polymorphkerniger Granulozyten nach ip-Injektion hitzegetöteter Mykoplasmen wurde entsprechend wiederholt.

3.2.3.1 Die durch Mykoplasmen induzierte Infiltration von Granulozyten war abhängig vom MALP-2-Gehalt in der Zytoplasmamembran

Bei *M. fermentans*, II-29/1 handelt es sich um einen durch Klonierung aus *M. fermentans*, D15-86 hervorgegangenen Klon mit einer sehr hohen Makrophagen stimulierenden Aktivität (430 kU/mg Protein). Andere Klone selben Ursprungs, wie z. B. Klon II-23 zeigen, ebenso wie der Referenzstamm *M. fermentans* PG18 mit 24 kU/mg bzw. 13 kU/mg Protein eine weitaus geringere Aktivität [128].

Um den Einfluß der Makrophagen stimulierenden Aktivität auf das Ausmaß der zellulären Wirtsantwort zu untersuchen, wurde die Infiltration von Granulozyten nach ip-Injektion verschieden aktiver *M. fermentans*-Klone miteinander verglichen. Die Injektion gleicher Proteinmengen (230 µg Protein pro Maus) des aktiven Klons II-29/1 und des 20fach geringer aktiven Klons II-23 führte nach 24 Stunden zunächst zu keinem signifikanten Unterschied im durchschnittlichen Prozentsatz eingewanderter Granulozyten (nicht gezeigt). Dies lag, wie ein Dosis-Wirkungs-Experiment deutlich machte, daran, daß die injizierten Proteinmengen bereits in einem Bereich maximaler Wirkung lagen (nicht gezeigt). Die zu injizierende Proteinmenge wurde aus diesem Grund auf ein Zehntel des Ursprungs (23 µg pro Maus) reduziert. Unter diesen Versuchsbedingungen konnte 24 Stunden nach Injektion des aktiven Klons II-29/1 eine deutlich stärkere Infiltration von Granulozyten induziert werden als nach Injektion gleicher Proteinmengen des *in vitro* geringer aktiven Referenzstammes *M. fermentans* PG18 (Abb. 19). Wurde die Einwanderung von Granulozyten bereits nach vier Stunden bestimmt, so war mit $34,1 \pm 14,9$ % nach Injektion von Klon II-29/1 bzw. $29,4 \pm 8,5$ % nach Injektion von PG 18, Klon 39 kein

signifikanter Unterschied zu beobachten.

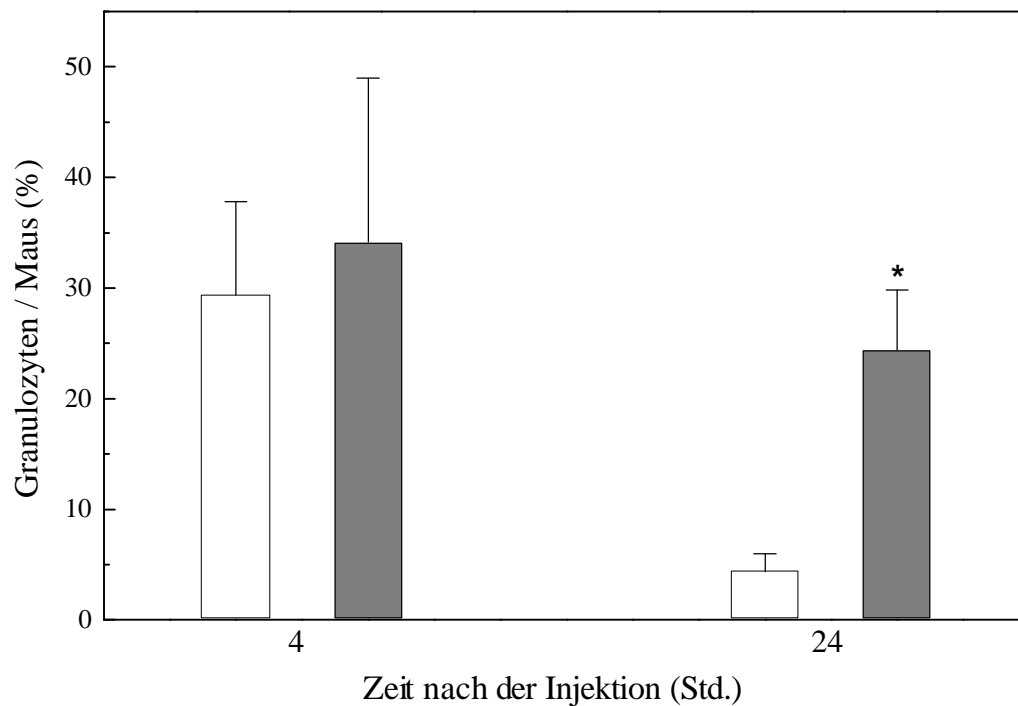


Abbildung 19: Einfluß des MALP-2-Gehalts hitzegetöteter Mykoplasmen auf die Infiltration von Granulozyten. Gruppen von jeweils drei NMRI-Mäusen wurden vier bzw. 24 Stunden nach ip-Injektion gleicher Proteinmengen (jeweils 23 µg) von *M. fermentans*, Klon II-29/1 (mit einer MSA von 430 kU/mg Protein) (schräg verlaufende Linien) und *M. fermentans* PG18 (mit einer MSA von 13 kU/mg Protein) (leere Säulen) getötet. Die entnommenen Peritonealzellen wurden auf Objektträger zentrifugiert und die Anzahl der Granulozyten nach Wright-Färbung durch Auszählen ermittelt. Die Daten sind Mittelwerte aus drei Mäusen ± Standardabweichung. * kennzeichnet einen nach Student's T-Test signifikanten Unterschied zwischen den beiden Klonen bei einem Signifikanzniveau von 0,05.

Dieser Versuch zeigte deutlich, daß zwischen einer frühen und einer später ablaufenden Infiltration von Granulozyten unterschieden werden mußte. Während die nach vier Stunden nachweisbare Granulozyteninfiltration bei beiden *M. fermentans*-Klonen in der gleichen Größenordnung lag und vom MALP-2-Gehalt unabhängig war, zeigte die Infiltration von Granulozyten nach 24 Stunden eine deutliche Abhängigkeit vom MALP-2-Gehalt des injizierten Klons. Somit bestand, zumindest in diesem Testsystem, ein direkter Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der nach 24 Stunden induzierten Granulozyteninfiltration durch ip-Injektion hitzegetöteter Mykoplasmen und deren Gehalt an Makrophagen stimulierender Aktivität.

Das gleiche Phänomen konnte auch bei der durch ip-Injektion von MALP-2-haltigen Liposomen und Kontroll-Liposomen induzierten Granulozyteninfiltration beobachtet werden (siehe 3.2.3.2). Hier wies die Anzahl infiltrierter Granulozyten zwei bzw. sechs Stunden nach der Injektion beider Liposomen-Präparationen keinen Unterschied auf. Erst beim nächsten Untersuchungszeitpunkt, 24 Stunden nach Injektion, war ein signifikanter Unterschied erstmals nachweisbar.

Die früh induzierte Granulozyteninfiltration durch hitzegetötete Mykoplasmen und Liposomen (unabhängig von einer MALP-2-Inkorporation) ist vermutlich auf eine Aktivierung des Komplementsystems zurückzuführen. Vorversuche zeigten, daß hitzegetötete Mykoplasmen (*M. fermentans*, Klon II-29/1) im Gegensatz zu gelöstem MALP-2 in der Lage sind, das humane Komplementfragment C5a zu generieren (U. Deiters, G. Sonntag, O. Götze, P. F. Mühlradt, unveröffentlicht). Die Aktivierung des murinen Komplementsystems durch negativ geladene Liposomen ist bereits beschrieben [30].

3.2.3.2 Die Kinetik der Leukozyteninfiltration nach ip-Injektion von hitzegetöteten *M. fermentans* sowie Liposomen-inkorporiertem und gelöstem MALP-2

Durch die ip-Injektion von MALP-2 konnte, unabhängig davon, ob MALP-2 in der natürlichen Zytoplasma- bzw. in einer synthetischen Liposomenmembran inkorporiert war, eine Chemotaxis induziert werden, die durch die lokale Infiltration polymorphkerniger Granulozyten gekennzeichnet war (siehe 3.2.1.2 und 3.2.1.3). Um einen möglichen Einfluß der Präparationsform von MALP-2 (gelöst oder partikulär) auf den zeitlichen Verlauf der Granulozyteninfiltration zu untersuchen, wurden jeweils Sechsergruppen von NMRI-Mäusen die verschiedenen MALP-2-Präparationen injiziert und die Granulozytenzahl im Peritonealraum zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion ermittelt. Eine voneinander abweichende Kinetik nach ip-Injektion der verschiedenen MALP-2-Präparationen konnte nicht von vornherein ausgeschlossen werden, da gelöstes MALP-2, im Gegensatz zu partikulärem, theoretisch schneller in die Zirkulation gelangen und somit lokal ausverdünnt werden könnte. Zusätzlich zur Anzahl der Granulozyten wurde auch die Gesamtleukozytenzahl im Peritonealraum bestimmt. Auf diesem Weg wurde überprüft, ob die bei einer Mykoplasmen-Infektion oftmals zu beobachtende zeitliche Gliederung in eine frühe Granulozyteninfiltration und eine späte Infiltration von Makrophagen und Lymphozyten auch durch Injektion verschiedener MALP-2-Präparationen induziert werden konnte. Liposomen ohne inkorporiertes MALP-2 und 0,9 %ige Kochsalzlösung dienten als Kontrollen (Abb. 20 A-E). Die Injektion hitzegetöteter *M. fermentans*, Klon II-29/1 führte bereits nach zwei Stunden zu einem signifikanten Anstieg der peritonealen Granulozytenzahl (Abb. 20 A). Diese erreichte im Zeitraum zwischen 24 und 48 Stunden nach Applikation ein Maximum. Auch am dritten Tag nach der Injektion lag die Zahl infiltrierter Granulozyten noch deutlich über der von Kontrolltieren, die mit 0,9 %iger Kochsalzlösung behandelt worden waren (Abb. 20 C). Hingegen ergab sich bei Betrachtung der peritonealen Gesamtleukozytenzahl nach Injektion hitzegetöteter *M. fermentans* eine von der Granulozytenzahl abweichende Kinetik: Ein signifikanter Anstieg der Leukozyten konnte, im Vergleich zu NaCl-behandelten Kontrolltieren, erst 24 Stunden nach der Injektion beobachtet werden. Diese Zunahme an Leukozyten hielt jedoch über den gesamten Untersuchungszeitraum an und erlangte erst am zweiten Tag mit einem Durchschnittswert von $11,1 \times 10^6 \pm 3,3 \times 10^6$ Zellen pro Maus ein Maximum.

Genau wie nach Injektion hitzegetöteter Mykoplasmen erreichte die Anzahl der Granulozyten nach ip-Injektion von gelöstem MALP-2 das Maximum in einem Zeitraum zwischen 24 und 48 Stunden nach der Applikation (Abb. 20 B). Zu den frühen Untersuchungszeitpunkten, zwei bzw. sechs Stunden nach Applikation, fiel die Anzahl der Granulozyten mit durchschnittlichen $0,14 \times 10^6 \pm 0,07 \times 10^6$ bzw. $0,3 \times 10^6 \pm 0,3 \times 10^6$ jedoch deutlich geringer aus als nach Applikation der partikulären MALP-2-Präparationen bzw. der Kontroll-Liposomen. Ebenso wie durch die Injektion von MALP-2-Liposomen bzw. hitzegetöteten Mykoplasmen wurde auch durch die Injektion von gelöstem MALP-2 ein Anstieg der Gesamtleukozytenzahl induziert. Diese erreichte, entsprechend der Leukozytenzahl nach Injektion hitzegetöteter Mykoplasmen, nach 48 Stunden mit $12,8 \times 10^6 \pm 3,4 \times 10^6$ Zellen pro Maus ein Maximum.

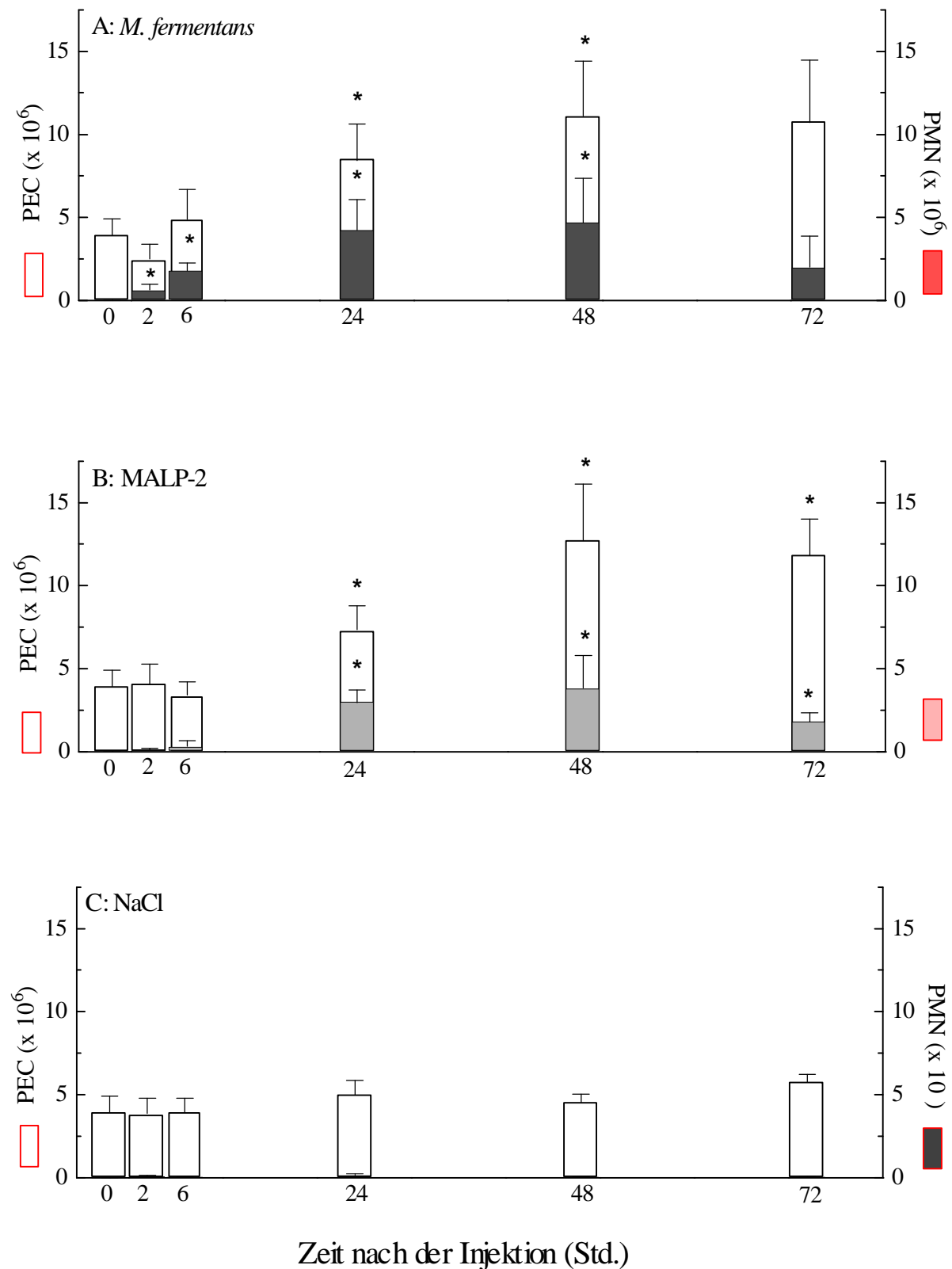
MALP-2 lag als Stammlösung in 2-Propanol/H₂O (1+1, v/v) vor. Für die Injektion wurde diese Stammlösung in 0,9 %iger NaCl verdünnt, so daß sich eine maximale Konzentration von 2,5 % (v/v) 2-Propanol ergab. Eine zur Kontrolle durchgeführte ip-Injektion von 2,5 % (v/v) 2-Propanol in 0,9 %iger Kochsalzlösung induzierte 48 Stunden nach Injektion mit durchschnittlichen $0,7 \times 10^4 \pm 0,6 \times 10^4$ Granulozyten pro Maus bzw. $3,5 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$ Gesamtleukozyten ($n = 3$) keinen nachweisbaren Zellinflux (nicht gezeigt).

Die Injektion von Liposomen-inkorporiertem MALP-2 führte ebenfalls zu einem Anstieg der Granulozytenzahl im Peritonealraum. Diese begann, ähnlich wie nach Injektion hitzegetöteter Mykoplasmen, nach zwei Stunden und erreichte nach 24 Stunden mit durchschnittlichen $6,7 \times 10^6 \pm 1,6 \times 10^6$ Granulozyten pro Maus ein Maximum (Abb. 20 D). Auch die Injektion von Kontroll-Liposomen führte zu einem nachweisbaren Anstieg der Granulozyten im Peritonealraum (Abb. 20 E). Mit maximalen $1,1 \times 10^6 \pm 0,7 \times 10^6$ nach 24 Stunden lag diese jedoch deutlich unterhalb der Granulozytenkonzentration, die nach Injektion MALP-2-haltiger Liposomen beobachtet werden konnte. Ebenso wie die Granulozytenzahl erreichte die Konzentration der Gesamtleukozyten 24 Stunden nach Injektion MALP-2-haltiger Liposomen ein Maximum. Diese war auch 48 bzw. 72 Stunden nach Injektion noch signifikant höher als nach Injektion von Kontroll-Liposomen. Die durchschnittliche Gesamtleukozytenzahl nach Injektion von Kontroll-Liposomen lag nur geringfügig über der von NaCl-behandelten Tieren.

Ein Einfluß der Präparationsform von MALP-2 auf den zeitlichen Verlauf der Granulozyteninfiltration war lediglich zu den frühen Zeitpunkten, zwei und sechs Stunden nach ip-Injektion, erkennbar: Die nach ip-Injektion von gelöstem MALP-2 im Peritonealraum nachweisbare Anzahl an Granulozyten war zu diesen Zeiten signifikant geringer als nach ip-Injektion von hitzegetöteten Mykoplasmen oder Liposomen-inkorporiertem MALP-2.

Bei den Granulozyten, die nach Injektion hitzegetöteter Mykoplasmen, gelöstem sowie Liposomen-inkorporiertem MALP-2 und Kontroll-Liposomen in den Peritonealraum eingewandert waren, handelte es sich in erster Linie um Neutrophile. Aber auch Eosinophile wurden nach ip-Injektion der verschiedenen MALP-2-Präparationen sowie nach ip-Injektion der Kontroll-Liposomen und NaCl identifiziert. Im Vergleich zu der NaCl-Kontrolle konnte ein signifikanter

Anstieg der absoluten Anzahl an Eosinophilen lediglich 48 Stunden nach ip-Injektion hitzegetöteter Mykoplasmen sowie 48 und 72 Stunden nach ip-Injektion von Liposomen-inkorporiertem MALP-2 nachgewiesen werden. Signifikante Unterschiede zwischen Kontroll-Liposomen und MALP-2-haltigen Liposomen lagen nicht vor (nicht gezeigt).



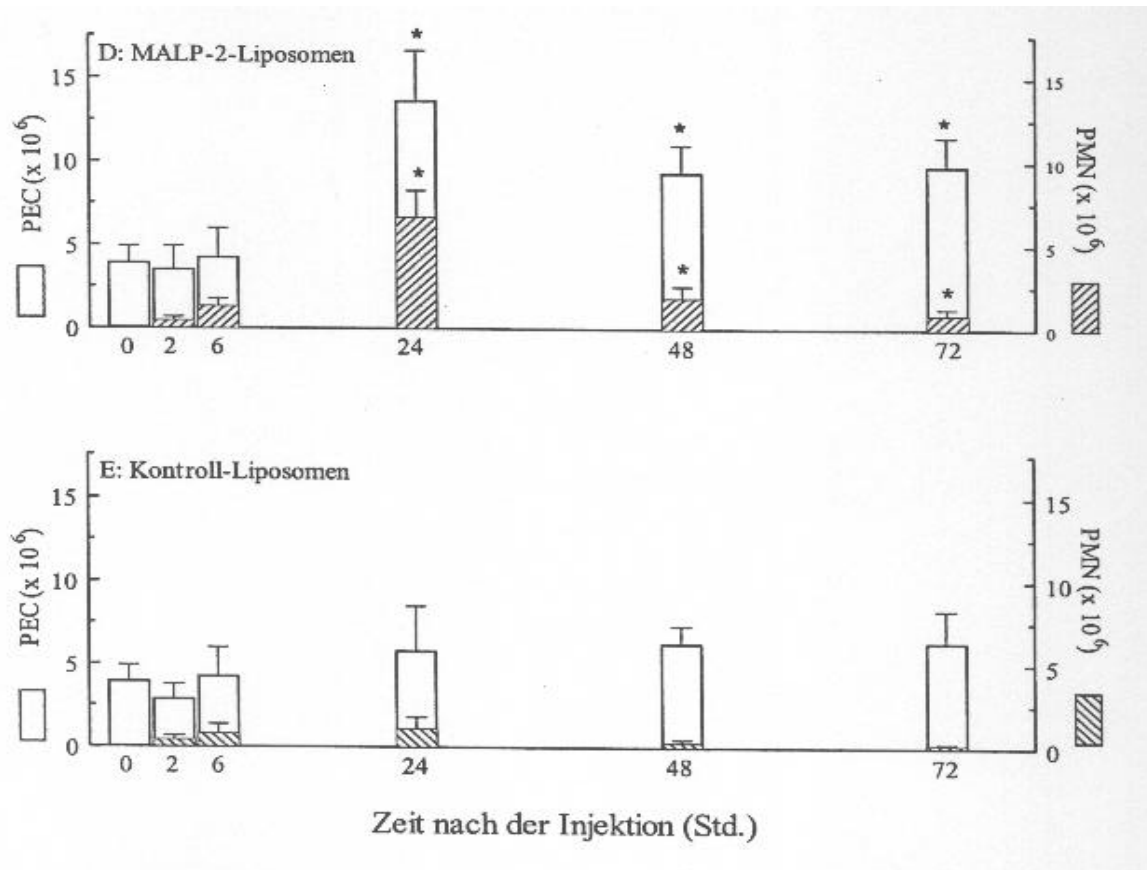


Abbildung 20: Infiltration von Leukozyten nach ip-Injektion von hitzegetöteten Mykoplasmen sowie gelöstem und Liposomen-inkorporiertem MALP-2. Gruppen von jeweils drei bis sechs NMRI-Mäusen wurden intraperitoneal je 400 μ l hitzegetötete *M. fermentans* (0,2 mg Protein mit einer MSA von 100 kU) (A), gelöstes MALP-2 (9 μ g mit einer MSA von 1000 kU) (B), 0,9 %ige NaCl (C), Liposomen-inkorporiertes MALP-2 (0,2 mg Lipid; 9 μ g MALP-2 mit einer MSA von 1000 kU) (D) oder Kontroll-Liposomen (0,2 mg Lipid) (E) injiziert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Mäuse getötet. Die entnommenen Peritonealzellen wurden nach der Bestimmung der Zellzahl auf Objektträger zentrifugiert und die Anzahl der Granulozyten nach Wright-Färbung durch Auszählen ermittelt. Die Daten sind Mittelwerte aus sechs Mäusen \pm Standardabweichung bzw. aus drei Mäusen \pm Standardabweichung für NaCl-behandelte Tiere. * kennzeichnet einen nach Student's T-Test signifikanten Unterschied zu den jeweiligen Kontrolltieren ($P < 0,05$).

3.2.3.3 Drei Tage nach ip-Injektion hitzegetöteter Mykoplasmen, gelöstem MALP-2 und Liposomen-inkorporiertem MALP-2 dominierten Makrophagen und/oder Monozyten im murinen Peritonealraum

Durch die ip-Injektion von MALP-2 sowohl in partikulärer als auch in gelöster Form konnte eine Infiltration polymorphkerniger Granulozyten in den Peritonealraum induziert werden, die in einem Zeitraum zwischen 24 und 48 Stunden ein Maximum erreichte (siehe 3.2.3.2).

Da 72 Stunden nach der Injektion die Anzahl der Granulozyten bereits reduziert, die Konzen-

tration der Gesamtleukozyten jedoch noch immer deutlich erhöht war, wurde mittels FACS-Analyse und spezifischer Antikörper versucht, die nach drei Tagen im Peritonealraum befindlichen Leukozyten zu differenzieren. Diese Methode wurde der Differenzierung Wright-gefärbter Zytopräparate zunächst vorgezogen, da letztere zwar die Identifizierung von Granulozyten erlaubte, eine lichtmikroskopische Differenzierung von Makrophagen und Lymphozyten, speziell von großen Lymphozyten, aufgrund des ähnlichen Aussehens jedoch nicht sicher durchgeführt werden konnte.

Eine FACS-Analyse wurde mit dem Makrophagen-spezifischen Antikörper “anti-F4/80”, dem B-Lymphozyten-spezifischen Antikörper “anti-CD19”, dem Granulozyten-spezifischen Antikörper “anti-Gr1” und dem für T-Lymphozyten spezifischen Antikörper “anti-Thy 1.2” durchgeführt. Neben dem Granulozyten-spezifischen Antikörper, der aufgrund der unterschiedlich starken Expression des Antigens auf den verschiedenen polymorphkernigen Granulozyten zum alleinigen Nachweis der Granulozyteninfiltration nicht weiter verwendet wurde (siehe 3.2.1.2), stellten sich auch die anderen Antikörper für die Differenzierung der peritonealen Leukozyten als z. T. wenig geeignet heraus. So wird die Expression des F4/80-Antigens auf der Oberfläche von Makrophagen durch eine Aktivierung der Zellen herabgesetzt [39]. Bei Mäusen, deren Peritonealzellen durch die ip-Injektion der verschiedenen MALP-2-Präparationen aktiviert worden waren, konnte folglich nicht unterschieden werden, ob eine nach Markierung mit “anti-F4/80” verminderte Anzahl fluoreszierender Zellen auf eine verringerte Zahl vorhandener Makrophagen oder aber auf die herabgesetzte Antigenexpression zurückzuführen war.

Auch die Identifizierung von B-Lymphozyten mit dem spezifischen Antikörper “anti-CD19” erwies sich als schwierig, da keine klare Trennlinie zwischen fluoreszierenden und somit Antikörper-markierten Zellen und nicht-fluoreszierenden Zellen erkennbar war. Das Setzen dieser Trennlinie hatte daher einen eher willkürlichen Charakter.

T-Lymphozyten konnten im Peritonealraum sowohl behandelter als auch unbehandelter Mäuse nur in einer Größenordnung von 2 - 5 % nachgewiesen werden. Eine signifikante Veränderung infolge der ip-Injektion von MALP-2-Präparationen war nicht nachzuweisen.

Die FACS-Analyse wurde somit zur Identifizierung der peritonealen Leukozyten nicht weiter verwendet. Stattdessen wurde sich mit der Fähigkeit zur Phagozytose eine gemeinsame Eigenschaft von Makrophagen und Granulozyten zunutze gemacht, über die Lymphozyten nicht verfügen. Im Anschluß an eine Inkubation der Peritonealzellen mit opsonisierten Staphylokokken konnte auf diesem Weg eine Differenzierung der peritonealen Leukozyten erfolgen: Das Vorhandensein phagozytierter Staphylokokken kennzeichnete Makrophagen und die nach Wright-Färbung ohnehin leicht zu identifizierenden Granulozyten, das Nichtvorhandensein die zur Phagozytose unfähigen Lymphozyten (Abb. 21).

Die Opsonisierung der Staphylokokken erfolgte durch deren Inkubation mit Humanserum. Im Serum enthaltene Antikörper binden hierbei an die Bakterien und machen sie für die Phagozyten erkennbar. Diese Erkennung erfolgt über die Fc γ -Rezeptoren der Phagozyten, die an die Fc-Region der Staphylokokken-gebundenen Antikörper (in der Regel IgG) binden.

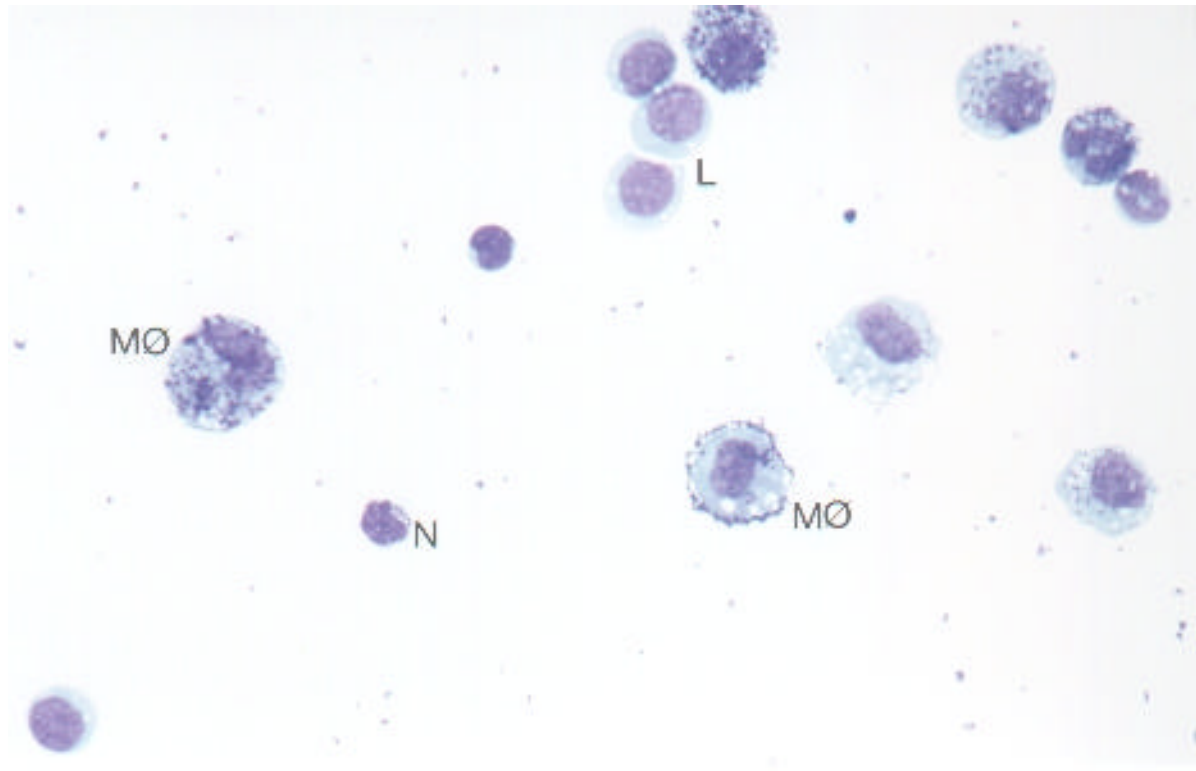


Abbildung 21: Lichtmikroskopische Aufnahme von murinen Peritonealzellen nach einer 10minütigen Inkubation mit opsonisierten Staphylokokken. Anfärbung nach Wright. L = Lymphozyt, MØ = Makrophage, N = Neutrophiler Granulozyt. Vergrößerung: 320fach.

Diese Methode ermöglichte es nun, die sich mehrere Tage nach der Injektion verschiedener MALP-2-Präparationen im Peritonealraum befindlichen Leukozyten zu differenzieren (Tab. 4). Sowohl die Injektion von hitzegetöteten Mykoplasmen als auch von Liposomen-inkorporiertem und gelöstem MALP-2 führte zu einem gegenüber der NaCl- bzw. der Liposomen-Kontrolle signifikanten Anstieg der absoluten Monozyten- und/oder Makrophagenzahl im Peritonealraum (eine Differenzierung von Monozyten und Makrophagen wurde nicht durchgeführt). Während die absolute Anzahl peritonealer Lymphozyten keine Veränderungen zeigte, wies die prozentuale Lymphozytenkonzentration eine signifikante Abnahme auf. Eine deutliche Veränderung der peritonealen Zellzusammensetzung nach Injektion von Kontroll-Liposomen konnte im Vergleich mit NaCl-behandelten Tieren nicht nachgewiesen werden.

| Behandlung | PEC | Makrophagen/Monozyten | | Lymphozyten | | PMN | |
|--|-----------------------|-----------------------|--------------|-----------------------|--------------|-----------------------|---------------|
| | (x 10 ⁶) | (x 10 ⁶) | (%) | (x 10 ⁶) | (%) | (x 10 ⁶) | (%) |
| <i>M. fermentans</i> (0,2 mg Protein) | 14,8 ± 5,9 | 7,1 ± 3,0 * | 48,7 ± 8,9 | 3,6 ± 2,0 | 25,4 ± 12 * | 3,9 ± 2,9 | 24,2 ± 14,8 * |
| MALP-2 (9 µg) | 11,2 ± 3,1 * | 5,0 ± 1,2 * | 47,4 ± 15,2 | 3,5 ± 1,2 | 32,0 ± 11 * | 2,6 ± 2,7 | 20,2 ± 13,2 * |
| MALP-2-Liposomen (9 µg) | 8,5 ± 1,2 * | 4,9 ± 0,9 * | 57,6 ± 8,1 * | 2,9 ± 1,0 | 33,4 ± 9,0 * | 0,8 ± 0,2 * | 9,7 ± 2,2 * |
| Kontroll-Liposomen | 6,4 ± 1,9 | 2,9 ± 1,2 | 44,5 ± 6,8 | 3,2 ± 0,9 | 51,8 ± 6,7 | 0,2 ± 0,08 | 2,9 ± 1,4 |
| NaCl (0,9 %) | 5,8 ± 0,5 | 2,8 ± 0,4 | 47,9 ± 1,7 | 2,8 ± 0,2 | 48,8 ± 1,0 | 0,05 ± 0,03 | 0,9 ± 0,6 |

Tabelle 4: Infiltration von Leukozyten 72 Stunden nach ip-Injektion von hitzegetöteten Mykoplasmen sowie gelöstem und Liposomen-inkorporiertem MALP-2. Gruppen von drei bis sechs NMRI-Mäusen wurden intraperitoneal je 400 µl 0,9 %ige NaCl, hitzegetötete *M. fermentans* (0,2 mg Protein mit einer MSA von 100 kU), gelöstes MALP-2 (9 µg mit einer MSA von 1000 kU), Liposomen-inkorporiertes MALP-2 (0,2 mg Lipid; 9 µg MALP-2 mit einer MSA von 1000 kU) und Kontroll-Liposomen (0,2 mg Lipid) injiziert. Nach 72 Stunden wurden die Mäuse getötet. Die entnommenen Peritonealzellen wurden im Anschluß an eine 10minütige Inkubation mit opsonisierten Staphylokokken zweimal gewaschen und auf Objektträger zentrifugiert. Nach Wright-Färbung wurde die Anzahl der verschiedenen Leukozyten durch Auszählen ermittelt. Die Daten sind Mittelwerte aus sechs Mäusen ± Standardabweichung bzw. aus drei Mäusen ± Standardabweichung für NaCl-behandelte Kontrollmäuse. * kennzeichnet einen nach Student's T-Test signifikanten Unterschied zu den jeweiligen Kontrolltieren (P < 0,05).

3.2.4 Die durch ip-Injektion von LPS induzierte Infiltration von Granulozyten

Das LPS gram-negativer Bakterien verfügt *in vitro*, ebenso wie das mykoplasmale Lipopeptid MALP-2, über die Fähigkeit, Makrophagen zur Freisetzung von Zyto- und Chemokinen zu stimulieren (siehe 3.2.2.1 und 3.2.2.2).

Auch *in vivo* kann durch die ip-Injektion von LPS eine zelluläre Wirtsantwort induziert werden, die durch eine Infiltration von Leukozyten am Entzündungsort charakterisiert ist [125]. Die Kinetik der Leukozyteninfiltration ist dabei abhängig vom verwendeten Mausstamm: LPS “*low-responder*“-Mäuse (C3H/HeJ) reagieren auf die ip-Injektion von 75 µg LPS aus *Salmonella typhosa* mit einer nach 12 Stunden maximalen Infiltration neutrophiler Granulozyten in den Peritonealraum. Ein entsprechender Verlauf der Granulozyteninfiltration ist bei den LPS-empfindlichen Mausstämmen C3Heb/Fej, CBA/J und B10D2/nSn nicht nachweisbar. Nach Injektion von 75 µg LPS steigt hier die Zahl der Granulozyten über den gesamten Untersuchungszeitraum von 72 Stunden kontinuierlich an.

Um einen auf die Infiltration polymorphkerniger Granulozyten bezogenen Vergleich der *in vivo* Aktivität von LPS und MALP-2 in NMRI-Mäusen zu erhalten, wurde diesen in einem Vorversuch eine LPS-Konzentration von 1 bis 10 µg pro Maus injiziert (n = 1). 24 Stunden nach ip-Injektion von 1 µg LPS aus *Salmonella typhimurium* lag die Granulozytenkonzentration bei 21,3 %, nach Applikation von 10 µg LPS bei 78,9 %. Die Injektion von 8 µg LPS pro Maus (n = 3) führte nach 24 Stunden zu einer prozentualen bzw. absoluten Anzahl infiltrierter Granulozyten von $60,3 \pm 7,1$ % bzw. $3,8 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^6$ und lag somit in einer Größenordnung wie nach Injektion hitzegetöteter Mykoplasmen sowie gelöstem und Liposomen-inkorporiertem MALP-2. 72 Stunden nach Injektion von 8 µg LPS pro Maus (n = 3) hatte die Konzentration der Granulozyten mit 5 ± 2 % bereits wieder deutlich abgenommen (nicht gezeigt).

Die von Moeller et al. bei den verschiedenen LPS-sensitiven Stämmen beobachtete und über einen Zeitraum von 72 Stunden stetige Infiltration von Granulozyten [125] konnte bei dem ebenfalls LPS-sensitiven Stamm NMRI nach ip-Injektion von LPS aus *Salmonella typhimurium* nicht reproduziert werden. Sowohl die Kinetik als auch der Umfang der Granulozyteninfiltration nach Applikation von LPS war dem Influx von Granulozyten nach Injektion von MALP-2 ähnlich. In beiden Fällen hatte die Granulozytenkonzentration nach 24 Stunden ein Maximum erreicht und fiel dann wieder ab.

3.2.5 Die durch ip-Injektion verschiedener MALP-2-Präparationen induzierte *in vivo* Freisetzung chemotaktisch und inflammatorisch wirkender Mediatoren

In den Versuchen mit kultivierten Peritonealmakrophagen erwies sich MALP-2 als ein sehr potenter Stimulator der Chemokinsynthese (siehe 3.2.2.1). Diese Eigenschaft ließ die Hypothese zu, daß die durch ip-Injektion von MALP-2 induzierte Infiltration von Leukozyten in den Perito-

nealraum u. a. auf die Freisetzung der chemotaktisch wirkenden Proteine MIP-1 α , MIP-2 und MCP-1 zurückzuführen war. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Konzentration der potentiell vorhandenen Chemokine sowohl in der Peritonealflüssigkeit als auch im Serum von behandelten Mäusen gemessen. Hierbei handelte es sich um dieselben Mäuse, die bereits für den Nachweis der Granulozyten- und Leukozyteninfiltration nach ip-Injektion verschiedener MALP-2-Präparationen (siehe 3.2.3.2) verwendet worden waren.

3.2.5.1 Kinetik der *in vivo* Freisetzung von Chemokinen nach Injektion hitzegetöteter Mykoplasmen sowie gelöstem und Liposomen-inkorporiertem MALP-2

Das u. a. auf Makrophagen chemotaktisch wirkende MIP-1 α wurde in der Peritonealflüssigkeit gemessen. Dort konnten, wie Vorversuche ergeben hatten (nicht gezeigt), trotz der durch Ausspülen des Peritonealraumes mit BSS erfolgten Verdünnung der Peritonealflüssigkeit im Vergleich zum Serum höhere Konzentrationen an sezerniertem MIP-1 α nachgewiesen werden. Eine Freisetzung von MIP-1 α war bereits zum frühesten Untersuchungszeitpunkt, zwei Stunden nach ip-Injektion hitzegetöteter Mykoplasmen, Liposomen-inkorporiertem sowie gelöstem MALP-2, aber auch nach Injektion von Kontroll-Liposomen, meßbar (Abb. 22). Sechs Stunden nach Injektion der drei MALP-2-Präparationen, besonders deutlich aber infolge der Injektion von Liposomen-inkorporiertem-MALP-2, erreichte die Konzentration des von den stimulierten Peritonealzellen freigesetzten MIP-1 α ein Maximum. Auch noch 24 Stunden im Anschluß an eine ip-Injektion konnte MIP-1 α in der Peritonealflüssigkeit der mit den verschiedenen MALP-Präparationen behandelten Tiere nachgewiesen werden. Ein Nachweis zu späteren Zeitpunkten war jedoch nicht mehr möglich. Die Peritonealflüssigkeit unbehandelter bzw. mit NaCl behandelter Tiere wies MIP-1 α -Konzentrationen auf, die unterhalb der Nachweisgrenze des ELISAs lagen. Meßbare Konzentrationen an freigesetztem MIP-1 α waren hingegen auch nach ip-Injektion von Kontroll-Liposomen nachweisbar. Diese lagen jedoch zu jedem Zeitpunkt unterhalb der Konzentrationen, die nach Injektion der MALP-2-Präparationen freigesetzt wurden. Bereits nach sechs Stunden ging die durch Kontroll-Liposomen induzierte Freisetzung von MIP-1 α wieder deutlich zurück, nach 24 Stunden war keine mehr nachweisbar.

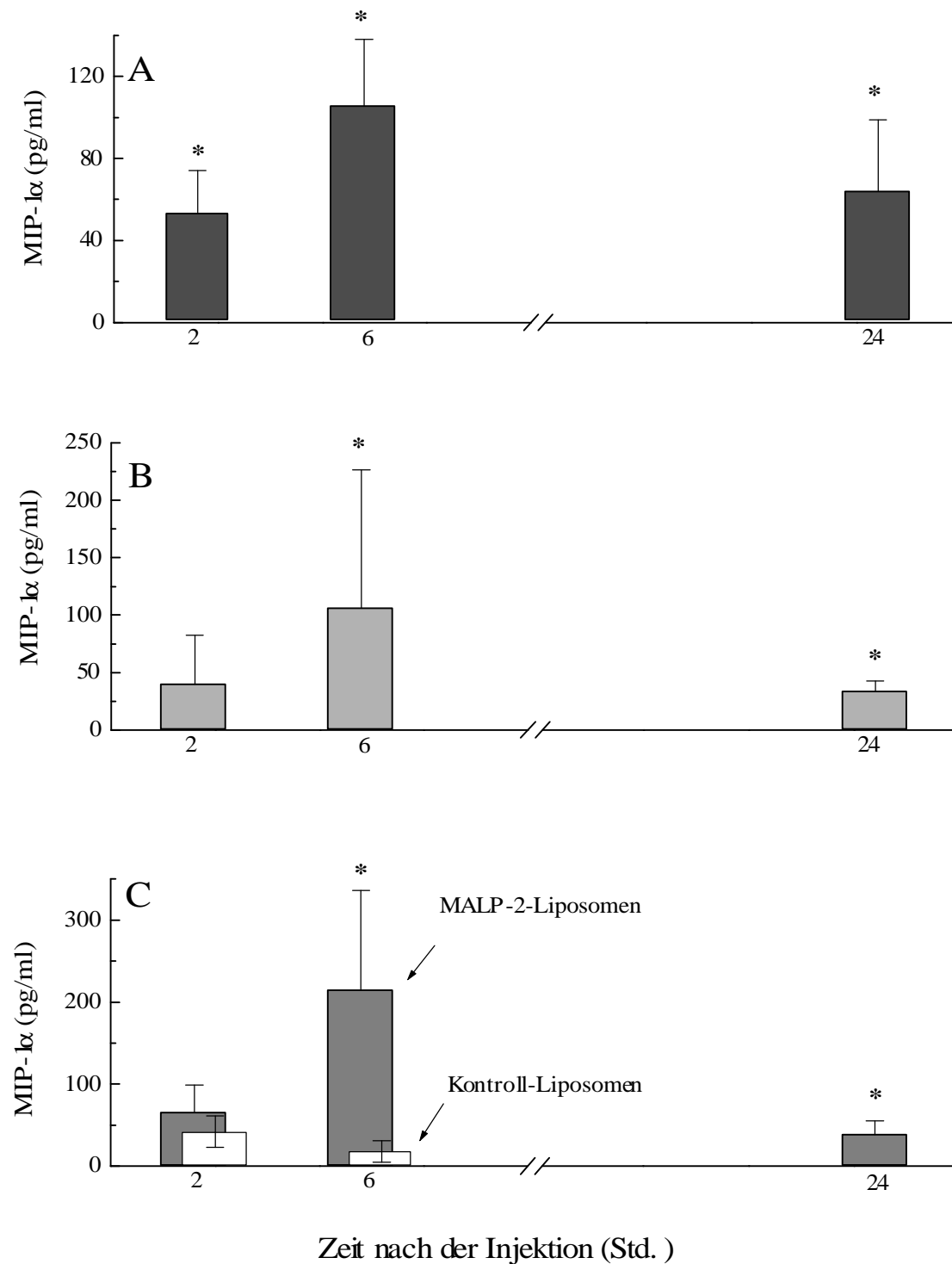
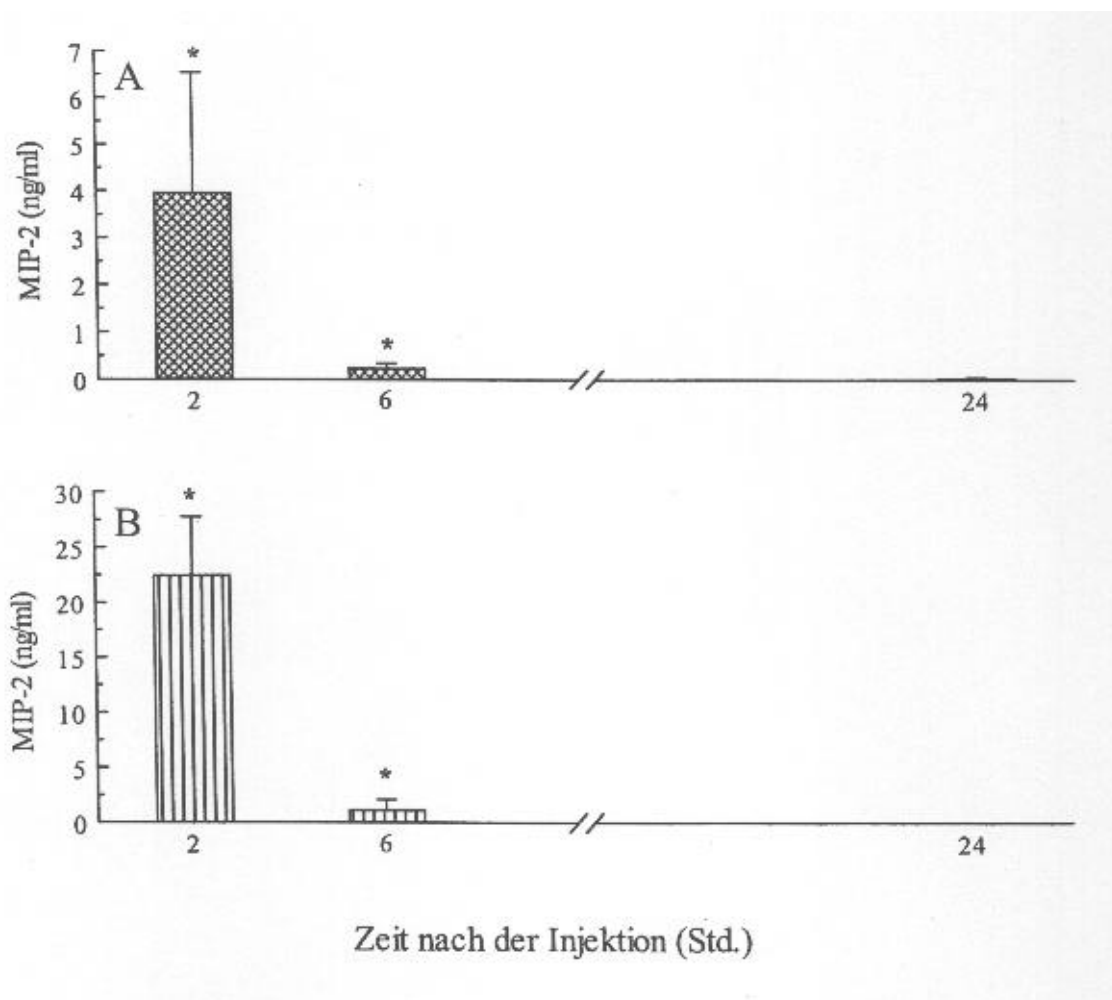


Abbildung 22: Kinetik der *in vivo* Freisetzung von MIP-1α. Die Freisetzung von MIP-1α wurde nach ip-Injektion von hitzegetöteten Mykoplasmen (A) (gekreuzte Schraffierung), gelöstem MALP-2 (B) (vertikale Linien), Liposomen-inkorporiertem MALP-2 (C) (schräg verlaufende Linien) und Kontroll-Liposomen (C) (leere Säulen) in der Peritonealflüssigkeit von NMRI-Mäusen gemessen. Es handelte sich hierbei um dieselben Tiere, die bereits für die Untersuchung der Leukozyteninfiltration (siehe 3.2.3.2) verwendet wurden. Die Daten sind Mittelwerte aus sechs Mäusen ± Standardabweichung bzw. aus drei Mäusen ± Standardabweichung für NaCl-behandelte Tiere. * kennzeichnet einen nach Student's T-Test signifikanten Unterschied zu den jeweiligen Kontrolltieren ($P < 0,05$).

Die *in vivo* Freisetzung von MIP-2, einem auf neutrophile Granulozyten chemotaktisch wirkenden Protein, ergab eine andere Kinetik. Bestimmt wurde die Freisetzung dieses Chemokins im Serum der mit hitzegetöteten Mykoplasmen, gelöstem und Liposomen-inkorporiertem MALP-2 sowie Kontroll-Liposomen und NaCl behandelten Tiere (Abb. 23).

Die dort meßbaren MIP-2-Konzentrationen waren um das Vier- bis Achtfache höher als in der Peritonealflüssigkeit (nicht gezeigt). Eine Ausnahme stellten Kontroll-Liposomen dar: Zwei Stunden nach deren Injektion lag die MIP-2-Konzentration in der Peritonealflüssigkeit um das Achtfache über der im Serum. Das Maximum der MIP-2-Freisetzung im Serum nach ip-Injektion der verschiedenen MALP-Präparationen wurde bereits nach zwei Stunden erreicht. Vor allem durch die Injektion von gelöstem MALP-2 wurden mit $22,5 \pm 5,3$ ng/ml sehr hohe MIP-2-Konzentrationen sezerniert. Im Gegensatz zu der Freisetzung von MIP-1 α in der Peritonealflüssigkeit nahm die MIP-2-Konzentration im Serum jedoch sechs Stunden nach Injektion bereits deutlich wieder ab. Zu diesem Zeitpunkt konnten keine oder nur noch sehr geringe Konzentrationen des Chemokins nachgewiesen werden, ebenso wie nach Injektion von NaCl und Kontroll-Liposomen. Serum und Peritonealflüssigkeit unbehandelter Tiere wiesen ebenfalls keine erhöhten MIP-2-Konzentrationen auf.



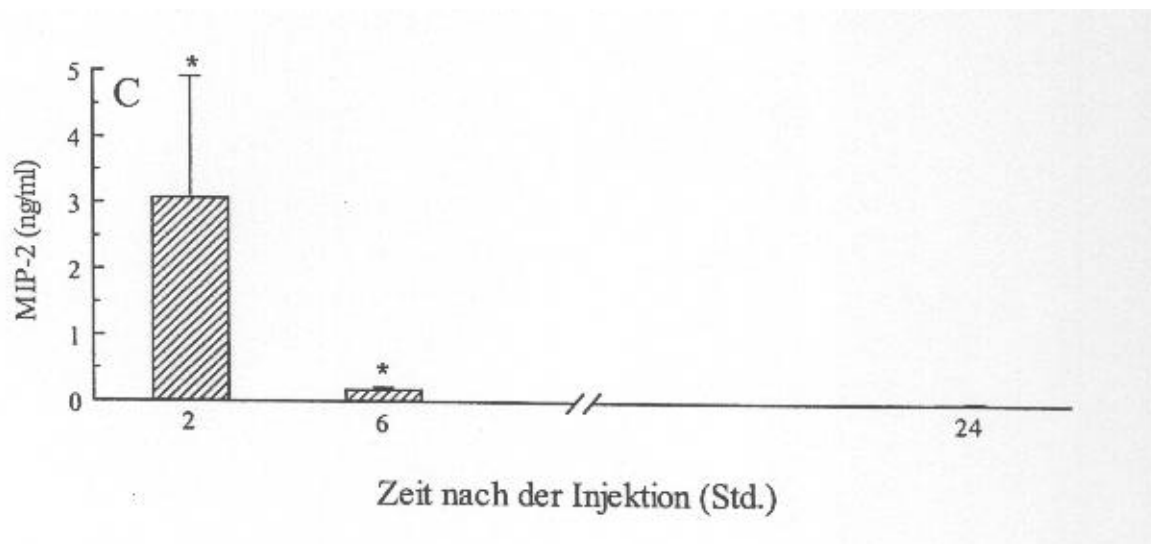


Abbildung 23: Kinetik der *in vivo* Freisetzung von MIP-2. Die Freisetzung von MIP-2 wurde nach ip-Injektion von hitzegetöteten Mykoplasmen (A) sowie gelöstem (B) und Liposomen-inkorporiertem MALP-2 (C) im Serum von NMRI-Mäusen gemessen. Es handelte sich hierbei um dieselben Tiere, die bereits für die Untersuchung der Leukozyteninfiltration (siehe 3.2.3.2) verwendet wurden. Die verwendeten Symbole entsprechen denen in Abbildung 22. Die Daten sind Mittelwerte aus sechs Mäusen \pm Standardabweichung bzw. aus drei Mäusen \pm Standardabweichung für NaCl-behandelte Tiere.

* kennzeichnet einen nach Student's T-Test signifikanten Unterschied zu den jeweiligen Kontrolltieren ($P < 0,05$).

Die Kinetik der *in vivo* Freisetzung von MCP-1, einem auf Monozyten chemotaktisch wirkenden Chemokin, ähnelte der *in vivo* Kinetik von MIP-2 insofern, als daß zwei Stunden nach Injektion von hitzegetöteten Mykoplasmen sowie Liposomen-inkorporiertem und gelöstem MALP-2 das Maximum der MCP-1-Freisetzung bereits erreicht war (Abb. 24). Auch hier erfolgte die mit $34,8 \pm 2,2$ ng/ml stärkste MCP-1-Freisetzung nach Injektion von gelöstem MALP-2. Sechs Stunden nach Injektion der MALP-2-Präparationen waren jedoch, anders als bei der MIP-2-Freisetzung, noch deutlich erhöhte MCP-1-Konzentrationen nachweisbar. Nach ip-Injektion hitzegetöteter Mykoplasmen war auch nach 24 Stunden die Konzentration des freigesetzten MCP-1 signifikant höher als nach Injektion von NaCl. Entsprechend der Kinetik von MIP-2 war die Konzentration an freigesetztem MCP-1 im Serum höher als in der Peri-tonealflüssigkeit.

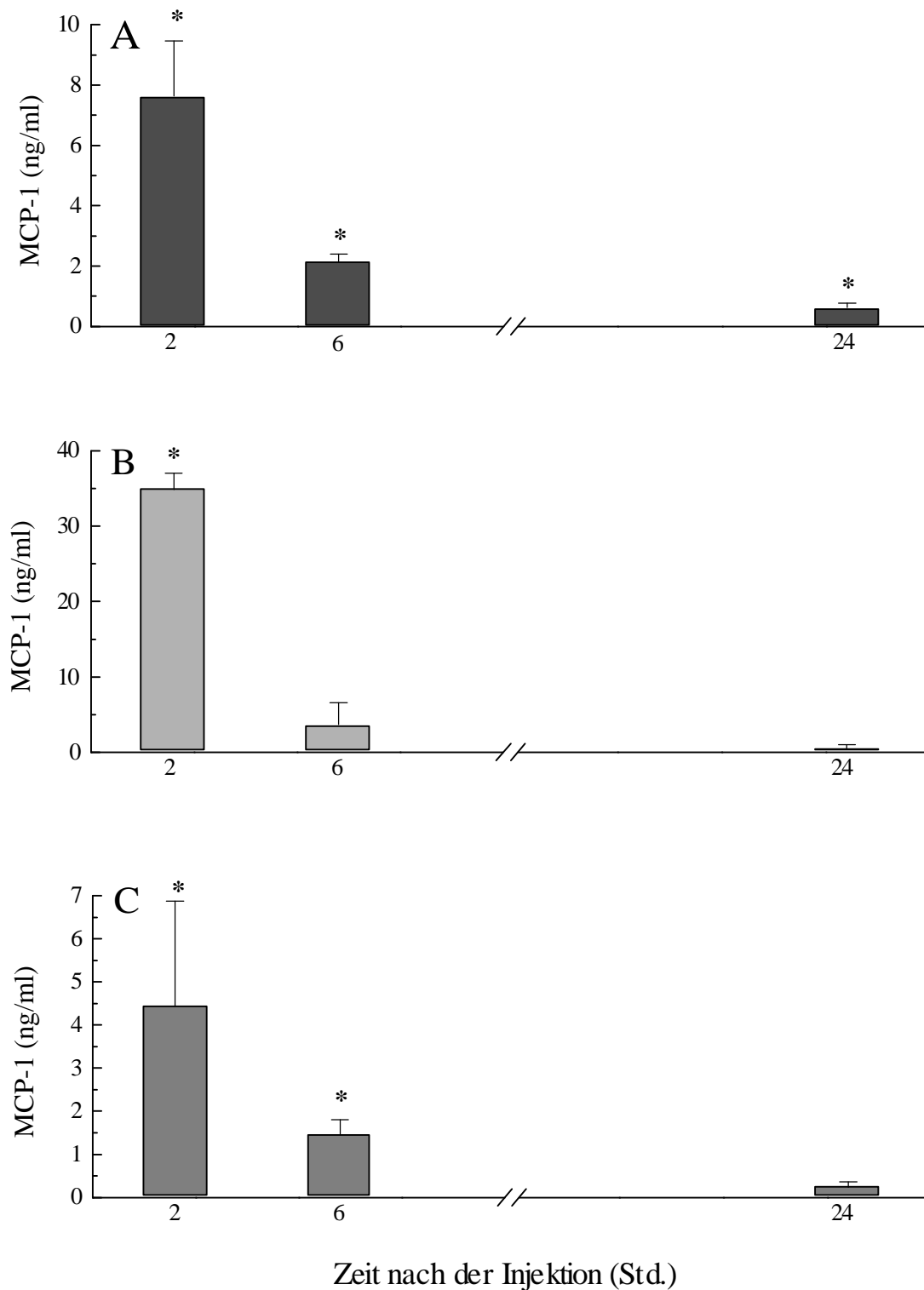


Abbildung 24: Kinetik der *in vivo* Freisetzung von MCP-1. Die Freisetzung von MCP-1 wurde nach ip-Injektion von hitzegetöteten Mykoplasmen (A) sowie gelöstem (B) und Liposomen-inkorporiertem MALP-2 (C) im Serum von NMRI-Mäusen gemessen. Es handelte sich hierbei um dieselben Tiere, die bereits für die Untersuchung der Leukozyteninfiltration (siehe 3.2.3.2) verwendet wurden. Die verwendeten Symbole entsprechen denen in Abbildung 22. Die Daten sind Mittelwerte aus drei Mäusen \pm Standardabweichung. * kennzeichnet einen nach Student's T-Test signifikanten Unterschied zu den jeweiligen Kontrolltieren ($P < 0,05$).

3.2.5.2 Die Kinetik der *in vivo* Freisetzung von IL-6 nach Injektion hitzegetöteter Mykoplasmen sowie gelöstem und Liposomen-inkorporiertem MALP-2

Mit dem Ziel, die durch Injektion verschiedener MALP-2-Präparationen induzierte *in vivo* Freisetzung von Chemokinen mit der *in vivo* Freisetzung der beiden proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α zu korrelieren, wurden letztere sowohl in der Peritonealflüssigkeit als auch im Serum der behandelten Mäuse bestimmt. TNF- α konnte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte nach Injektion, weder in der Peritonealflüssigkeit noch im Serum, in gegenüber den Kontrollen signifikant erhöhten Konzentrationen nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze des TNF- α -Bioassays lag bei 5 pg/ml.

Im Gegensatz zu TNF- α konnten sowohl im Serum als auch in der Peritonealflüssigkeit deutlich erhöhte Konzentrationen von IL-6 detektiert werden. Ähnlich wie auch schon bei MIP-2 und MCP-1 (siehe Abb. 23 und 24) wurde mit $27,3 \pm 3,8$ ng/ml eine besonders hohe IL-6-Freisetzung zwei Stunden nach Injektion von gelöstem MALP-2 im Serum nachgewiesen (Abb. 25). Die durch Injektion von hitzegetöteten Mykoplasmen bzw. Liposomen-inkorporiertem MALP-2 induzierte IL-6-Freisetzung fiel zu diesem Zeitpunkt mit $7,4 \pm 3,9$ ng/ml bzw. $4,3 \pm 3,4$ ng/ml deutlich geringer aus. Nach Injektion von Kontroll-Liposomen und NaCl lag die IL-6-Konzentration im Serum sowohl nach zwei als auch nach sechs Stunden unterhalb der Nachweisgrenze von 1,6 ng/ml.

Wie im Serum war auch in der Peritonealflüssigkeit zwei Stunden nach Injektion der verschiedenen MALP-2-Präparationen das Maximum der IL-6-Freisetzung bereits erreicht (nicht gezeigt). Hier lag jedoch mit $8 \pm 2,5$ ng/ml die durch Injektion von gelöstem MALP-2 freigesetzte IL-6-Konzentration erheblich unter der im Serum. Demgegenüber wiesen die zwei Stunden nach der Injektion von hitzegetöteten Mykoplasmen und Liposomen-inkorporiertem MALP-2 freigesetzten IL-6-Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede zu den Serumkonzentrationen auf. Anders als im Serum konnte mit $2,4 \pm 2$ ng/ml eine erhöhte Freisetzung von IL-6 auch zwei Stunden nach Applikation von Kontroll-Liposomen in der Peritonealflüssigkeit nachgewiesen werden. Die Injektion von NaCl führte zu keinem Zeitpunkt und in keiner der beiden Körperflüssigkeiten zu IL-6-Werten oberhalb der Nachweisgrenze von 1,6 ng/ml.

Sechs bzw. 24 Stunden nach Injektion der verschiedenen MALP-2-Präparationen waren sowohl im Serum als auch in der Peritonealflüssigkeit keine gegenüber den Kontrollen signifikant erhöhten IL-6-Konzentrationen mehr meßbar.

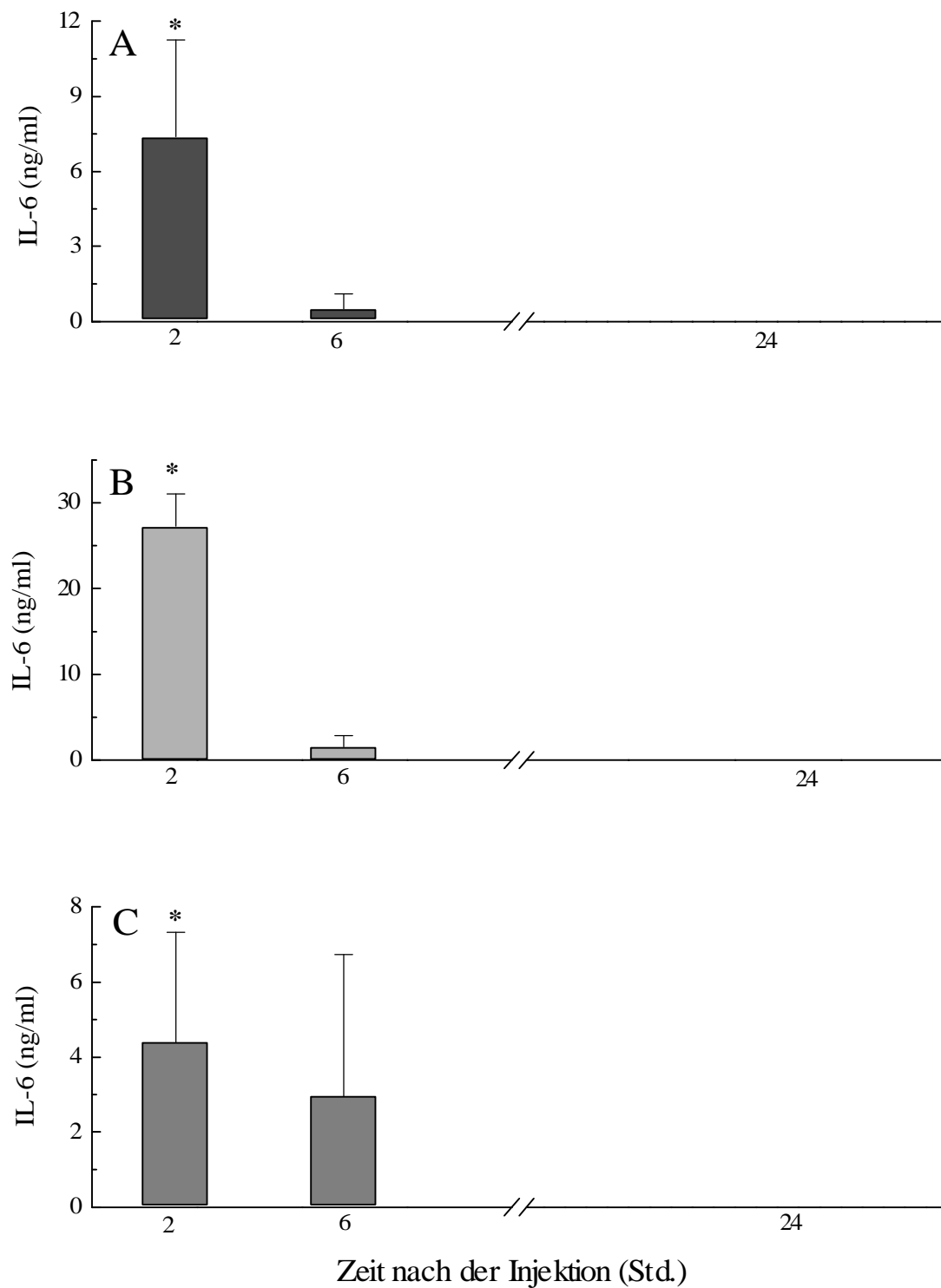


Abbildung 25: Kinetik der *in vivo* Freisetzung von IL-6. Die Freisetzung von IL-6 wurde nach ip-Injektion von hitzegetöteten Mykoplasmen (A) sowie gelöstem (B) und Liposomen-inkorporiertem MALP-2 (C) im Serum von NMRI-Mäusen gemessen. Es handelte sich hierbei um dieselben Tiere, die bereits für die Untersuchung der Leukozyteninfiltration (siehe 3.2.3.2) verwendet wurden. Die verwendeten Symbole entsprechen denen in Abbildung 22. Die Daten sind Mittelwerte aus sechs Mäusen \pm Standardabweichung bzw. aus drei Mäusen \pm Standardabweichung für NaCl-behandelte Tiere. * kennzeichnet einen nach Student's T-Test signifikanten Unterschied zu den jeweiligen Kontrolltieren ($P < 0,05$).

3.2.5.3 Die durch ip-Injektion von gelöstem MALP-2 induzierte Freisetzung von TNF- α

In vitro verfügt MALP-2, ebenso wie LPS, über die Fähigkeit, Makrophagen zur Freisetzung von TNF- α zu stimulieren (siehe 3.2.2.2). Bereits nach einer Stunde kann eine deutlich erhöhte TNF- α -Konzentration im Kulturüberstand MALP-2-stimulierter Peritonealmakrophagen nachgewiesen werden, die nach drei bis vier Stunden ein Maximum erreicht und dann wieder abfällt [47].

In vivo kann eine erhöhte Freisetzung von TNF- α auch nach intravenöser oder intraperitonealer Injektion von LPS induziert werden. Nach Evans und Zuckerman führt die iv-Applikation von 10 μ g LPS pro Maus (BALB/c) zu einer TNF- α -Freisetzung im Serum, welche nach einer Stunde mit ca. 9 ng/ml ein Maximum aufweist, nach drei Stunden jedoch nicht mehr meßbar ist [38]. TNF- α -Konzentrationen von ca. 16 ng/ml konnten Zuckerman und Bendele noch zwei Stunden nach ip-Applikation hoher LPS-Dosen (ca. 0,6 mg LPS pro Maus) im Serum von BALB/c-Mäusen nachweisen [200].

Im Rahmen der eigenen Untersuchungen wurde, im Gegensatz dazu, eine signifikant erhöhte TNF- α -Freisetzung durch ip-Injektion von hitzegetöteten Mykoplasmen sowie gelöstem und Liposomen-inkorporiertem MALP-2 zu keinem der untersuchten Zeitpunkte (beginnend mit zwei Stunden nach Injektion), weder im Serum noch in der Peritonealflüssigkeit, beobachtet. Um zu überprüfen, ob diese unterbliebene TNF- α -Freisetzung auf einen zu spät gewählten Untersuchungszeitpunkt oder aber auf eine prinzipiell nicht erfolgende *in vivo* Freisetzung von TNF- α nach Injektion von MALP-2 zurückzuführen war, wurde die TNF- α -Konzentration bereits eine Stunde nach ip-Injektion von gelöstem MALP-2 im Serum und in der Peritonealflüssigkeit bestimmt. Im Serum konnte nach Injektion von 9 μ g gelöstem MALP-2 in NMRI-Mäuse ($n = 3$) eine TNF- α -Konzentration von 1701 ± 739 pg/ml nachgewiesen werden. In der Peritonealflüssigkeit lag diese bei 1549 ± 716 pg/ml. Die durch ip-Injektion von 15 μ g LPS pro Maus ($n = 3$) nach einer Stunde freigesetzte TNF- α -Konzentration war mit 8125 ± 6897 pg/ml im Serum und 2364 ± 1034 pg/ml in der Peritonealflüssigkeit deutlich höher. Im Serum von unbehandelten Mäusen ($n = 3$) wurde eine TNF- α -Konzentration von 236 ± 95 pg/ml, in der Peritonealflüssigkeit von 62 ± 25 pg/ml nachgewiesen (nicht gezeigt). Die Nachweisgrenze des TNF- α -Bioassays lag bei 5 pg/ml.

Der Versuch bewies, daß genauso wie LPS, auch MALP-2 die Fähigkeit zur *in vivo* Freisetzung von TNF- α besaß. Bereits zwei Stunden nach Injektion wurde dieses jedoch in so großem Umfang wieder abgebaut oder neutralisiert, daß ein Nachweis signifikant erhöhter Konzentrationen sowohl im Serum als auch in der Peritonealflüssigkeit zu diesem Zeitpunkt nicht mehr möglich war.

3.2.6 MALP-2 als Mediator der LPS-Toleranz ?

Die Behandlung mit subletalen LPS-Dosen führt bei Mensch und Tier zu einer Desensibilisierung gegenüber einer später applizierten, ursprünglich letal wirkenden LPS-Dosis. Dieses Phänomen wird als Endotoxintoleranz bezeichnet.

LPS und auch MALP-2 sind sowohl *in vitro* (siehe 3.2.2.2) als auch *in vivo* (3.2.5.3) in der Lage, Makrophagen zur Freisetzung endogener Pyrogene zu stimulieren.

In einem “*in vivo-in vitro*-Testsystem” konnte durch die primäre Injektion von 80 µg LPS aus *Salmonella abortus equi* pro NMRI-Maus und einer nach drei Tagen *in vitro* erfolgenden Sekundärstimulation mit LPS bzw. MALP eine verminderte TNF- α -Synthese durch Peritonealmakrophagen nachgewiesen werden (U. Schade und P. F. Mührladt, unveröffentlicht). Mit dem Ziel, durch die ip-Injektion von MALP eine Endotoxintoleranz zu induzieren, wurde dieses Versuchssystem im Rahmen erster Vorversuche beibehalten. Anstelle von TNF- α , dem zentralen Zytokin im Endotoxinschock, erfolgte der Nachweis einer potentiell induzierten Toleranz in diesen Vorversuchen zunächst durch die Bestimmung von IL-6. Dies hatte lediglich einen praktischen Grund: So war die Bestimmung von IL-6 im ELISA deutlich weniger zeitaufwendig als die Bestimmung von TNF- α im Bioassay. Als Kontrolle diente die Primärinjektion von pyrogenfreier Kochsalzlösung in NMRI-Mäuse. 72 Stunden nach ip-Injektion hitzegetöteter *M. fermentans*, Klon II-29/1 (mit einer Makrophagen stimulierenden Aktivität von 300 kU) betrug die IL-6-Freisetzung der isolierten Peritonealmakrophagen nach Sekundärstimulation mit 10 ng LPS aus *Salmonella typhimurium* bzw. 10 U MALP-H nur noch ca. 2 % der IL-6-Freisetzung der Kontrolltiere (nicht gezeigt). In diesem System schien somit die Induktion einer Endotoxintoleranz durch Primärinjektion hitzegetöteter Mykoplasmen möglich.

Die Fähigkeit des Lipopeptids MALP-2, eine Endotoxintoleranz zu induzieren, wurde daraufhin in einem “*in vivo-in vivo*-Testsystem” untersucht. Im Gegensatz zum “*in vivo-in vitro*-System” erfolgte hierbei auch die sekundäre Stimulation durch eine ip-Injektion von LPS. Dieses Testsystem hatte den Vorteil einer einfacheren und schnelleren Handhabung. Darüber hinaus spiegelt ein *in vivo* System die im Organismus ablaufenden Reaktionen präziser wider und ist somit, z. B. für die klinische Anwendung, von größerer Relevanz.

Nach Dr. M. Freudenberg (Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg; persönliche Mitteilung) beginnt eine Endotoxintoleranz, die durch Applikation von 0,1 bis 1 µg LPS pro Maus induziert und durch eine reduzierte TNF- α -Freisetzung nachgewiesen werden kann, in einem *in vivo*-Testsystem nach ca. drei Stunden und hält bis zu einer Woche lang an.

Unter Berücksichtigung dieses Zeitrahmens wurden die Versuche nach folgendem Schema durchgeführt: 3, 24 und 72 Stunden nach der primären ip-Injektion von NaCl, R-MALP-2 (2,3 µg) bzw. LPS (1 µg) aus *Salmonella typhimurium* pro NMRI-Maus erfolgte eine zweite ip-Injektion von jeweils 1 µg LPS. Sechzig Minuten nach der Sekundärinjektion von Endotoxin wurden die Mäuse getötet und das Serum gewonnen. Die mit LPS vorbehandelten Mäuse dienten in diesem Versuch als Positiv-, die mit Kochsalzlösung vorbehandelten Tiere als Negativkontrol-

len. Letztere zeigten die Reaktion nicht-toleranter Tiere auf eine LPS-Injektion. Sowohl nach primärer ip-Injektion von LPS als auch nach primärer ip-Injektion von gelöstem MALP-2 und der sich anschließenden, sekundären ip-Injektion von LPS konnte eine Endotoxintoleranz, gemessen als reduzierte TNF- α -Freisetzung, nachgewiesen werden (siehe Abb. 26 A). Aufgrund starker Schwankungen, vor allem bei den mit NaCl vorbehandelten Tieren, war eine signifikante Reduktion jedoch lediglich zu den Zeitpunkten "24 und 72 Stunden nach Primär-injektion" von MALP-2 bzw. "3 und 24 Stunden nach Primärinjektion" von LPS feststellbar. Gänzlich unbehandelte Tiere wiesen eine TNF- α -Konzentration im Serum von 144 ± 117 pg/ml auf. Neben TNF- α konnte nach Vorbehandlung mit LPS bzw. MALP-2 auch eine Reduktion der LPS-induzierten IL-6-Freisetzung nachgewiesen werden (siehe Abb. 26 B). Diese beschränkte sich bei der Vorbehandlung mit MALP-2 auf die Zeitspanne von "24 Stunden zwischen Primär- und Sekundärinjektion". Zu den anderen beiden Zeitpunkten (3 und 72 Stunden zwischen Primär- und Sekundärinjektion) war die Differenz der IL-6-Freisetzung zwischen NaCl- und MALP-2-vorbehandelten Tieren nur geringfügig und keinesfalls signifikant. Im Gegensatz dazu führte die Vorbehandlung mit LPS sowohl zum Zeitpunkt "24 als auch 72 Stunden zwischen Primär- und Sekundärinjektion" zu einer signifikant reduzierten IL-6-Freisetzung. Auch zum Zeitpunkt "3 Stunden" war die IL-6-Freisetzung deutlich reduziert, erreichte jedoch aufgrund der Schwankungen kein signifikantes Niveau. Die Konzentration von IL-6 im Serum unbehandelter Mäuse lag unterhalb der Nachweisgrenze von 1,6 ng IL-6/ml.

Wie diese *in vivo* Versuche deutlich zeigten, konnte durch die Vorbehandlung von Versuchstieren mit MALP-2 eine Endotoxintoleranz induziert werden (Kreuztoleranz), die durch eine reduzierte Freisetzung inflammatorischer Zytokine (TNF- α und IL-6) gekennzeichnet war. Wird die reduzierte TNF- α -Freisetzung als Maßstab für eine Toleranz betrachtet, so hielt diese Toleranz über einen Zeitraum von 72 Stunden zwischen Primär- und Sekundärinjektion an. Im Gegensatz dazu war die durch MALP-2 induzierte Reduktion der IL-6-Freisetzung zu diesem Zeitpunkt bereits wieder aufgehoben.

Als ein Problem bei dem Versuch zur Endotoxintoleranz erwiesen sich die stark voneinander abweichenden Reaktionen der individuellen Mäuse auf die Injektionen. So zeigten zwei der insgesamt 18 Kontrolltiere (Primärinjektion: NaCl, Sekundärinjektion: 1 μ g LPS) weder eine erhöhte TNF- α -, noch eine erhöhte IL-6-Freisetzung. Obwohl ein Fehler beim Injizieren nach persönlichem Dafürhalten nicht wahrscheinlich war, konnte diese Möglichkeit nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Weiterhin zeigten vier der mit NaCl vorbehandelten Kontrolltiere zwar eine erhöhte IL-6-Freisetzung, jedoch keine erhöhten TNF- α -Konzentrationen.

Da die MALP-2- bzw. LPS-induzierte Endotoxintoleranz trotz der individuellen Schwankungen deutlich erkennbar war, wurde auf eine erneute Wiederholung des Versuchs zum Zweck der statistischen "Optimierung" und somit auf den Gebrauch zusätzlicher Versuchstiere verzichtet. Entsprechend hohe Schwankungen waren bereits bei den mit NMRI-Mäusen durchgeführten *in vivo* Versuchen zur Leukozyteninfiltration sowie den Versuchen zur Chemokinfreisetzung beobachtet worden (siehe z. B. 3.2.3.2 oder 3.2.5.1). Auch *in vitro* konnten bei Dosis-Wirkungs-

Experimenten mit Peritonealmakrophagen aus verschiedenen NMRI-Mäusen unterschiedliche Maxima der freigesetzten Chemokin- und Zytokinkonzentrationen ermittelt werden (nicht gezeigt). Vom individuellen Spender abhängige Schwankungen wurden ebenso bei der durch mykoplasmale Lipopeptide induzierten Zytokinfreisetzung humaner Monozyten nachgewiesen (G. Jahns und P. F. Mühlradt, unveröffentlicht).

Die genannten Beispiele lassen die Hypothese zu, daß die beobachteten Schwankungen auf genetisch bedingte Unterschiede zwischen den einzelnen Individuen zurückzuführen waren.

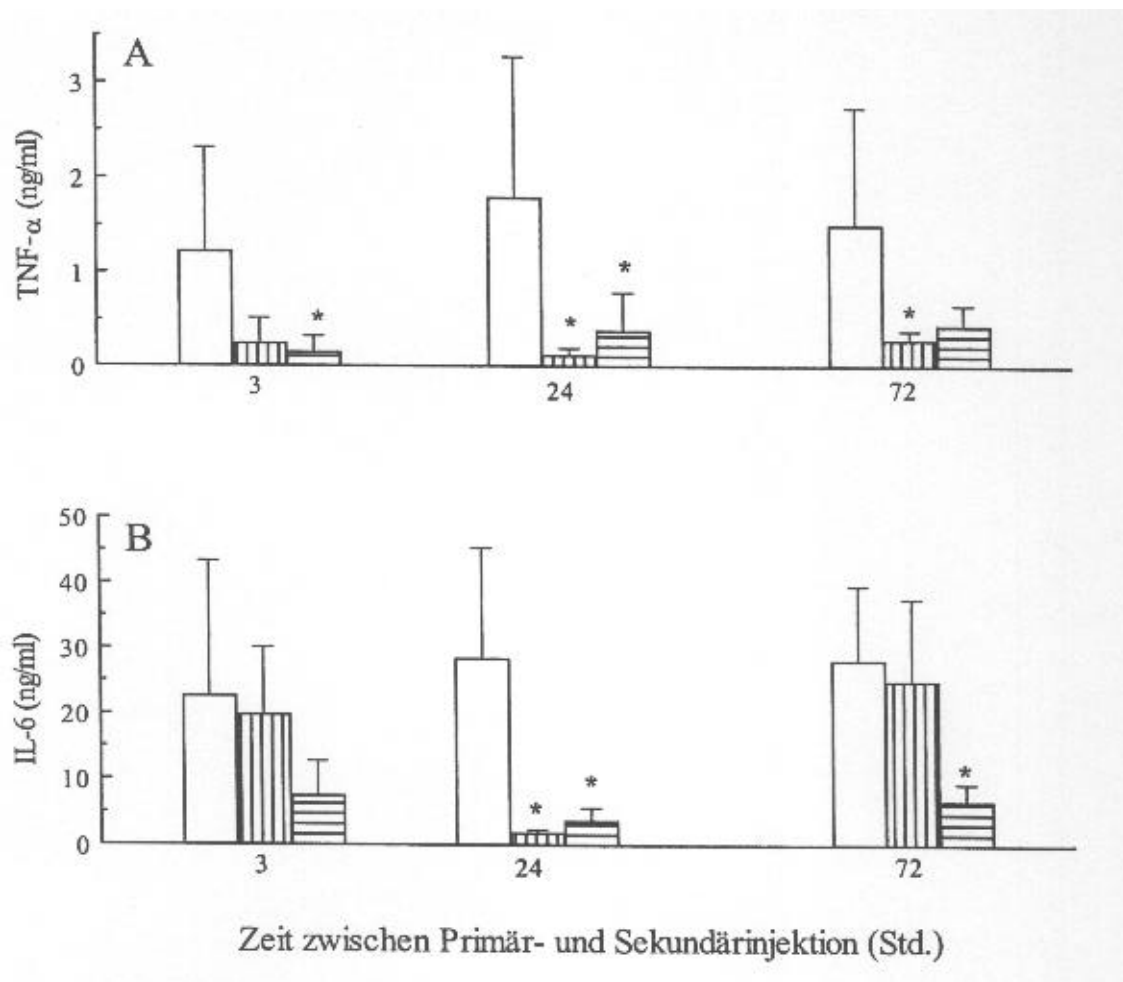


Abbildung 26: Inhibition der LPS-induzierten Freisetzung von TNF- α und IL-6 durch MALP-2 und LPS. Gruppen von jeweils sechs NMRI-Mäusen wurden jeweils 400 μ l 0,9 %ige NaCl-Lösung (leere Säulen), gelöstes (*R*)-MALP-2 (2,3 μ g) (vertikale Linien) oder LPS (1 μ g) aus *Salmonella typhimurium* (horizontale Linien) intraperitoneal injiziert. Zu den angegebenen Zeiten erhielten die Mäuse eine Sekundärinjektion von jeweils 1 μ g LPS. Jeweils nach Ablauf einer weiteren Stunde wurden die Mäuse getötet und das gewonnene Serum im ELISA bzw. im Bioassay auf das Vorhandensein von TNF- α (A) bzw. IL-6 (B) untersucht. Die Daten sind Mittelwerte aus sechs Mäusen \pm Standardabweichung. * kennzeichnet einen nach Student's T-Test signifikanten Unterschied zu den jeweiligen, NaCl-vorbehandelten Kontrolltieren ($P < 0,05$).

4 DISKUSSION

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht MALP-2, ein membrangebundenes Makrophagen stimulierendes Lipopeptid aus *M. fermentans*. Dieses Lipopeptid, das inzwischen auch synthetisch hergestellt werden kann [128], verfügt über die Fähigkeit, *in vitro* humane Monozyten und murine Makrophagen zur Freisetzung von IL-1, IL-6, TNF- α und Prostaglandinen [126, 127, 128] sowie IFN- γ -stimulierte murine Makrophagen zur Freisetzung von Stickstoffmonoxid [154] zu stimulieren. Vom Braun'schen Lipopeptid anderer Eubakterien unterscheidet sich MALP-2 durch den freien N-Terminus und dem daraus resultierenden Vorhandensein von lediglich zwei Fettsäuren (siehe Abbildung 2).

Die Existenz Makrophagen stimulierender Lipopeptide mit freiem N-Terminus konnte auch bei einer anderen Mykoplasmen-Spezies, bei *M. hyorhina*, nachgewiesen werden [129] und ist somit kein alleiniges Charakteristikum von *M. fermentans*. Es wird im Gegenteil sogar angenommen, daß es sich bei dem freien N-Terminus um ein generelles Merkmal von Lipoproteinen aus Mykoplasmen handelt, welches für das Makrophagen stimulierende Potential von entscheidender Bedeutung ist: So führt die Acylierung des N-Terminus zu einer deutlichen Abnahme der Makrophagen stimulierenden Aktivität im NO-Test [129].

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob MALP-2 auch *in vivo* die Fähigkeit besitzt, Makrophagen zu aktivieren und sie zur Freisetzung verschiedener Mediatoren zu stimulieren. MALP-2 stand dabei stellvertretend für die Vielzahl mykoplasmaaler Lipopeptide, die aufgrund des freien N-Terminus über eine vergleichbare Struktur und somit über ein ähnlich hohes Makrophagen stimulierendes Potential verfügen. Trotz der vorhandenen *in vitro* Aktivität konnte die Fähigkeit von MALP-2 zur *in vivo* Stimulation von Makrophagen jedoch nicht zweifelsfrei vorausgesagt werden. So wiesen Hauschildt et al., deren synthetisch hergestelltes Lipopeptid-Analogon aus gram-negativen Bakterien, "Pam₃Cys-Ala-Gly", *in vitro* eine Makrophagen stimulierende Wirkung zeigt [59], eine entsprechende *in vivo* Aktivität in Form von freigesetzten Zytokinen nicht nach [60].

Das Hauptaugenmerk der eigenen *in vivo* Untersuchungen richtete sich auf eine mögliche Beteiligung von MALP-2 an der Infiltration von Leukozyten am Infektionsort. Diese Leukozyteninfiltration gehört zu der nichtadaptiven, früh induzierten Immunreaktion des Wirtsorganismus und kann bei Infektionen mit pathogenen Mikroorganismen beobachtet werden. Bei einer Infektionen mit gram-negativen Bakterien ist die Leukozytenchemotaxis in erster Linie auf Endotoxin zurückzuführen [77], das die Zellen des Immunsystems aktiviert und sie u. a. zur Freisetzung von Chemokinen stimuliert. Aktivierte Makrophagen stellen dabei die Hauptquelle der Chemokine und anderer, die Leukozytenchemotaxis beeinflussender Mediatoren, dar. Die Infiltration von Leukozyten kann aber auch bei Infektionen mit den zellwand- und somit LPS-losen Mykoplasmen nachgewiesen werden [28, 70, 101, 147, 180]. Mit Ausnahme einer Membranprotein-Präparation aus *M. pulmonis*, die *in vitro* chemotaktische Wirkung gegenüber B-

Lymphozyten zeigt [149], war über die mykoplasmaalen Komponenten, die diese Leukozyteninfiltration auszulösen vermögen, bisher nichts bekannt. Die funktionelle Ähnlichkeit von MALP-2 und LPS im Hinblick auf die Aktivierung von Makrophagen machte das mykoplasmaale Lipopeptid jedoch zu einem vielversprechenden Kandidaten der Mykoplasmen-induzierten Leukozyteninfiltration. Aus diesem Grund wurde die potentielle Fähigkeit von MALP-2 zur Stimulation der Chemokinfreisetzung zuerst *in vitro* und schließlich auch *in vivo* untersucht. Für die *in vivo* Untersuchungen wurde MALP-2, das unter natürlichen Bedingungen in der Zytoplasmamembran von *M. fermentans* eingebunden ist, zusätzlich in ein synthetisches und somit definiertes Membransystem (Liposomen) inkorporiert.

Nachdem die prinzipielle *in vivo* Aktivität von MALP-2 in Form einer Freisetzung von Zyto- und Chemokinen und einer daraus resultierenden Leukozytenchemotaxis nachgewiesen werden konnte, wurde eine weitere mögliche *in vivo* Aktivität von MALP-2 überprüft: die Fähigkeit, eine Toleranz gegenüber Endotoxin zu induzieren. Endotoxin ist wie MALP-2 ein potenter Makrophagenstimulator (s. o.) und vermag u. a. die Freisetzung verschiedener Zytokine (z. B. TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-6) zu induzieren. Die Applikation subletaler Endotoxin-Dosen resultiert *in vivo* in einem Toleranzstatus gegenüber letalen Endotoxin-Dosen und basiert auf einer eingeschränkten Synthese und Freisetzung verschiedener Zytokine, darunter TNF- α und IFN- γ [37, 123].

Die beiden untersuchten *in vivo*-Aktivitäten von MALP-2 stehen in keinem direkten Zusammenhang und werden daher unabhängig voneinander diskutiert.

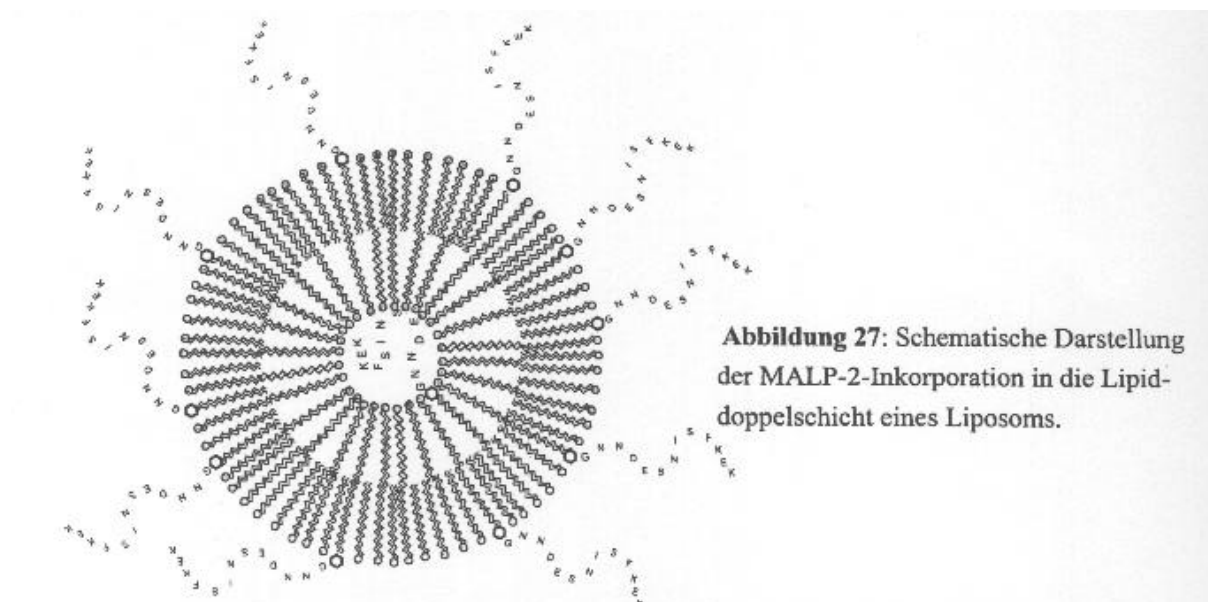
4.1 Die Inkorporation von MALP-2 in Liposomen

Mykoplasmen verfügen über eine große Anzahl und Mannigfaltigkeit membrangebundener Lipoproteine [22, 45, 67]. In isolierter, d. h. aus der Zytoplasmamembran herausgelösten Form kommen diese Lipoproteine natürlicherweise nicht vor. MALP-2, ein aus *M. fermentans* isoliertes Lipopeptid, wurde daher, für die in dieser Arbeit zu untersuchende *in vivo* Aktivität, in Liposomen inkorporiert. Bei Liposomen handelt es sich um synthetische Membransysteme, deren Anwendung sowohl bei der Eliminierung [186] als auch bei der Stimulation [184] von Makrophagen vielfach dokumentiert ist.

Bei der Zusammensetzung der herzustellenden Liposomen wurden folgende Kriterien berücksichtigt: 1. sollten die Liposomen der natürlichen Zytoplasmamembran der Mykoplasmen weitgehend ähnlich sein und 2. sollten sie durch die Makrophagen des Wirtsorganismus bevorzugt erkannt und phagozytiert werden können. Durch die Verwendung negativ geladener Phospholipide, darunter PG, das mit 20 % aller polaren Lipide eine Hauptkomponente der Zytoplasmamembran von *M. fermentans* ausmacht [29], wurden diese Vorgaben erfüllt. Der Einbau anionischer Phospholipide resultiert sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in einer erhöhten Phagozytose der Liposomen durch Makrophagen [82, 97, 162]. Eine zusätzliche Inkorporation von Lactosylceramid in die Liposomenmembran hatte dagegen keinen Einfluß auf die Phagozytose durch

Peritonealmakrophagen (siehe 3.1.2.2). Dieser Befund steht im Widerspruch zu Untersuchungen von Haensler und Schubert, die nach Verankerung von Galaktosylresten an der Liposomenoberfläche eine erhöhte Phagozytoserate durch murine Peritonealmakrophagen hatten nachweisen können [56]. Die unterschiedliche Zusammensetzung der Liposomen von Haensler und Schubert und der in dieser Arbeit hergestellten Liposomen läßt den direkten Vergleich der Ergebnisse nur eingeschränkt zu. Eine mögliche Ursache für die Diskrepanz könnte jedoch in der vergleichsweise geringeren Konzentration des in dieser Arbeit eingesetzten und somit inkorporierten Lactosylceramid liegen.

Wie in Abb. 27 schematisch dargestellt, wird MALP-2 mit den lipophilen Fettsäureresten in die Lipiddoppelschicht des Liposoms integriert, während der hydrophile Proteinanteil des Moleküls in das wäßrige Kompartiment hineinragt bzw. sich an der Liposomenoberfläche orientiert. Abweichend von der Abbildung handelte es sich bei den innerhalb dieser Arbeit hergestellten Liposomen um multilamellare Strukturen.



Eine erfolgreiche und stabile Inkorporation von MALP-2 in die Liposomenmembran konnte durch die Kosedimentation von MALP-2 und Liposomen nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, daß nahezu 100 % des bei der Herstellung eingesetzten MALP-2 in die Liposomenmembran integriert wurden (siehe Tabelle 3). Die Fähigkeit des mykoplasmaalen Lipopeptids, IFN- γ -stimulierte murine Peritonealmakrophagen zur Freisetzung von NO zu aktivieren, blieb auch nach der Inkorporation in die Liposomenmembran erhalten (siehe z. B. Abb. 11). Kontroll-Liposomen ohne MALP-2-Inkorporation fehlte diese Fähigkeit. Die für halbmaximale NO-Freisetzung benötigte Konzentration an Liposomen-gebundenem MALP-2 war jedoch deutlich höher als die des optimal solubilisierten MALP-2. Dieser, auf die suboptimale Solubilisierung des mykoplasmaalen Lipopeptids zurückzuführende Aktivitätsverlust, wurde bereits mehrfach dokumentiert [127, 128, 129]. Er ist auch dann zu beobachten, wenn MALP-2 in die mykoplasmale Zytoplasmamembran integriert ist. Um ein mit Mykoplasmen vergleichbares Verhalten der Liposomen und somit deren Eignung für

die durchzuführenden *in vivo* Tests zu überprüfen, wurde die Makrophagen stimulierende Aktivität MALP-2-haltiger Liposomen und hitzegetöteter Mykoplasmen im NO-Test direkt verglichen. Dabei konnte nachgewiesen werden, daß der Charakter der umgebenden Membran keinen Einfluß auf die Aktivität von MALP-2 ausübte (siehe 3.1.3.1). Die im Gegensatz dazu voneinander abweichende Phagozytosekinetik MALP-2-haltiger Liposomen und hitzegetöteter Mykoplasmen (siehe 3.1.3.2) kann u. a. auf unterschiedliche Sedimentationsraten zurückgeführt werden, die durch die Größen- und Formunterschiede der Partikel bedingt sind.

Durch die intravenöse Applikation der hergestellten Liposomen (mit und ohne inkorporiertes MALP-2) in Kaninchen konnte nachgewiesen werden, daß die Liposomen-Präparationen frei von einer eventuellen LPS-Kontamination waren. Diese hätte zu einer biphasischen, nach ca. 20 Minuten einsetzenden Erhöhung der Körpertemperatur [31] geführt. Eine Beteiligung von LPS an den im Rahmen dieser Arbeit beobachteten *in vivo* Reaktionen konnte somit ausgeschlossen werden.

4.2 Die MALP-2-induzierte Infiltration von Leukozyten

Wie bereits erwähnt, führt die Infektion mit pathogenen Mykoplasmen zu einer zellulären Wirtsantwort, die durch eine Infiltration von Leukozyten am Infektionsort gekennzeichnet ist. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob das Lipopeptid MALP-2 aus *M. fermentans*, stellvertretend für eine Vielzahl anderer mykoplasmaaler Lipopeptide mit entsprechender Struktur (siehe Abb. 2) und somit auch entsprechender Makrophagen stimulierender Aktivität, an der Auslösung dieser Leukozyteninfiltration beteiligt ist. Zu diesem Zweck wurde NMRI-Mäusen intraperitoneal MALP-2, sowohl in freier als auch in Liposomen-gebundener Form, appliziert. Als positive Kontrolle fungierten Mykoplasmen, die, um unkontrollierbare Faktoren, wie z. B. die Teilungsrate oder die Verteilung im Wirtsorganismus, ausschließen zu können, hitzegetötet wurden. NMRI-Mäuse wurden ausgewählt, weil ihre Zellen 1. weder ungewöhnlich sensibel (*“high-responder”*) noch ungewöhnlich resistent (*“low-responder”*) auf eine Behandlung mit MALP-2 reagierten (siehe 3.2.1.1) und weil es sich 2. bei ihnen um Auszuchtmäuse handelte. Ihre Reaktionen auf die injizierten Stimulanzen kamen daher einer natürlichen und individuellen Wirtsantwort am nächsten und waren nicht auf ein genetisch determiniertes, abnormes Verhalten von Inzuchttieren zurückzuführen.

Das in dieser Arbeit angewendete *in vivo* Versuchssystem einer intraperitonealen Injektion von Mykoplasmen bzw. deren Bestandteile ist nur eingeschränkt auf die natürliche Situation bei einer Infektion anzuwenden, da Mykoplasmen in erster Linie die Schleimhäute des Respirations- und des Urogenitaltraktes besiedeln. An diesen Stellen ist die Reaktion des Wirtsorganismus, z. B. die lokale Freisetzung von Zyto- und Chemokinen oder die Infiltration von Leukozyten, jedoch nur schwer zu quantifizieren. Da das Anliegen dieser Arbeit vorrangig in dem Nachweis und der Charakterisierung einer Wirtsreaktion auf das mykoplasmale Lipopeptid MALP-2 bestand, wurde

mit dem Peritonealraum ein *in vivo*-Testsystem ausgewählt, in dem diese Reaktionen relativ einfach und präzise zu beurteilen waren. Die durch ip-Injektion von Agenzien, darunter MALP-2, chemotaktisch angelockten Leukozyten gelangen über das große Omentum in den Peritonealraum [35]. Von anderen Arbeitsgruppen wurde die intraperitoneale Injektion bereits zum Nachweis einer Wirtsantwort auf *Mycobacterium avium* [5], Lipopeptide gram-negativer Bakterien [60], Leukotriene [54] oder Zytokine [157] genutzt.

Eine nach ip-Injektion hitzegetöteter *M. fermentans* erfolgende Infiltration polymorphkerniger Granulozyten in den Peritonealraum von NMRI-Mäusen konnte bereits nach zwei Stunden, dem frühesten Untersuchungszeitpunkt, nachgewiesen werden und erreichte nach 24 bis 48 Stunden ein Maximum (siehe Abb. 20 A). Eine entsprechend frühe und nach 24 Stunden maximale Granulozyteninfiltration war ebenso nach ip-Injektion MALP-2-haltiger Liposomen sowie, in einem deutlich geringeren Umfang, auch nach Injektion von Kontroll-Liposomen zu beobachten (siehe Abb. 20 D und 20 E). Die durch Injektion von gelöstem MALP-2 induzierte Infiltration von Granulozyten begann deutlich später, erreichte das Maximum aber ebenfalls in einem Zeitraum von 24 bis 48 Stunden nach der Injektion (siehe Abb. 20 B). Durch Applikation pyrogenfreier Kochsalzlösung wurde zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Granulozyteninflux ausgelöst (siehe Abb. 20 C). Somit konnte eine Infiltration von Granulozyten als Folge einer lokalen Verletzung durch die intraperitoneale Injektion ausgeschlossen werden.

Drei Tage nach der Injektion von hitzegetöteten Mykoplasmen bzw. von MALP-2, in gelöster sowie Liposomen-inkorporierter Form, war trotz einer deutlichen Abnahme polymorphkerniger Granulozyten die Anzahl der Leukozyten im Peritonealraum behandelter Mäuse noch deutlich erhöht (siehe Abb. 20). Diese erhöhte Leukozytenzahl konnte auf einen signifikanten Anstieg an Makrophagen und/oder Monozyten im Peritonealraum der behandelten Mäuse zurückgeführt werden. Im Gegensatz dazu blieb die totale Anzahl an Lymphozyten unverändert (siehe Tabelle 4). Eine frühe Infiltration polymorphkerniger Granulozyten und eine sich daran anschließende Infiltration von Makrophagen und Lymphozyten wurden auch von Lindsey et al. nach Infektion von Mäusen mit *M. pulmonis* beobachtet [101]. Kennedy et al. dokumentierten einen entsprechend zeitlichen Verlauf der Leukozyteninfiltration nach Infektion der Milchdrüsen von Schafen mit Ureaplasmen [86].

Da die Existenz von Lipopeptiden mit freiem N-Terminus und der daraus resultierenden hohen Makrophagen stimulierenden Aktivität ein generelles Charakteristikum von Mykoplasmen darzustellen scheint, ist anzunehmen, daß auch die von Lindsey et al. beobachtete Leukozyteninfiltration auf entsprechende mykoplasmale Bestandteile zurückzuführen ist. Der von Kennedy et al. bei einer Ureaplasmen-Infektion nachgewiesene Leukozyteninflux gibt darüber hinaus Anlaß zu der Annahme, daß auch die zur Ordnung der Mycoplasmatales zugehörige Gattung der Ureaplasma (siehe 1.1) diese Lipopeptide in der Zytoplasmamembran exprimiert. Die Aktivierung muriner Makrophagen durch Ureaplasmen ist bereits dokumentiert [20].

Die in dieser Arbeit nach Injektion der verschiedenen MALP-2-Präparationen bzw. Kontroll-Liposomen zu beobachtende Infiltration polymorphkerniger Granulozyten in den Peritonealraum behandelter NMRI-Mäuse konnte in eine frühe und eine späte Phase unterteilt werden. Die frühe Phase, welche in einem Zeitraum von zwei bis sechs Stunden nach der Injektion begann, wurde nach Injektion der partikulären Präparationen beobachtet. Sie war von MALP-2 unabhängig und konnte daher auch nach Injektion von Kontroll-Liposomen nachgewiesen werden (siehe Abb. 20 E). Die späte Phase der Granulozyteninfiltration war durch ein Maximum infiltrierter Granulozyten nach ein bis zwei Tagen gekennzeichnet und wurde, im Gegensatz zur frühen Phase, auch durch die Injektion von gelöstem MALP-2 induziert (siehe Abb. 20 C). Mit ihr verlief parallel bzw. sich daran anschließend die Infiltration von Makrophagen und/oder Monozyten.

Der Granulozyteninfiltration beider Phasen lagen jeweils unterschiedliche Mechanismen zugrunde. Ein für die frühe Phase in Frage kommender Mechanismus war die durch partikuläre Präparationen induzierbare Aktivierung des Komplementsystems über den alternativen Weg, in dessen Verlauf es zur Synthese der chemotaktisch wirkenden Komplementfaktoren C3a und C5a kommt. Eine Aktivierung des murinen Komplementsystems durch Liposomen, insbesondere durch solche mit negativer Oberflächenladung, wie sie auch in dieser Arbeit zum Einsatz kamen, wurde bereits dokumentiert [30]. Den Beweis dafür, daß die Aktivierung des Komplementsystems eine schnelle und nur auf wenige Stunden beschränkte Infiltration von Granulozyten zur Folge hat, erbrachten Collins et al.: Sie wiesen zwei Stunden nach ip-Applikation von Zymosan eine chemotaktische Aktivität in der Peritonealflüssigkeit behandelte Kaninchen nach, die sie mittels spezifischer Antikörper als Komplementkomponente C5a identifizierten. Sechs Stunden nach der Zymosan-Injektion war die chemotaktische Aktivität der Peritonealflüssigkeit von C5a bereits unabhängig [26].

Über eine mögliche Aktivierung des Komplementsystems durch Mykoplasmen ist nur wenig bekannt. Zudem ist eine Vielzahl älterer Arbeiten bezüglich Mykoplasmen und Komplementaktivierung nur schwer zu interpretieren, da die Kulturmedien der Mykoplasmen oftmals Hefekomponenten und somit Komplement aktivierende Kontaminationen enthielten. Die in dieser Arbeit verwendeten Mykoplasmen wurden in einem definierten und von Zymosan-ähnlichen Kontaminationen freiem Kulturmedium angezüchtet, so daß eine dadurch bedingte Komplementaktivierung ausgeschlossen werden konnte. Vorversuche erbrachten jedoch einen Hinweis darauf, daß der für die *in vivo* Versuche primär verwendete *M. fermentans*, Klon II-29/1, in der Lage ist, humanes C5 zu aktivieren und es in chemotaktisch aktives C5a sowie in C5b zu spalten (nicht gezeigt). Anders als hitzegetötete Mykoplasmen besaß gelöstes MALP-2 die Fähigkeit zur C5-Spaltung nicht (U. Deiters, G. Sonntag, O. Götze, P. F. Mühlradt, unveröffentlicht). Dieses Ergebnis bestätigte die Annahme, daß die MALP-2-induzierte späte Phase der Granulozyteninfiltration von der Aktivierung des Komplementsystems unabhängig war. Hitzegetötete Mykoplasmen sowie Liposomen (s. o.) waren demgegenüber als partikuläre Substanzen in der Lage, eine Komplementaktivierung zu induzieren und ermöglichten auf diesem Weg die frühe und MALP-2-unabhängige Infiltration von Granulozyten.

1998 wiesen Matsumoto et al. [115] die Aktivierung der Komplementkomponente C3 durch ein Lipoprotein aus *M. fermentans* nach, dessen N-Terminus mit MALP-2 identisch ist und das inzwischen als MALP-404 identifiziert wurde [15]. Dem in dieser Arbeit eingesetzten und zur C5-Spaltung fähigen *M. fermentans*-Klon II-29/1 fehlt dieses Lipoprotein jedoch [15], so daß neben MALP-404 noch andere mykoplasmale Komponenten an der Aktivierung des Komplementsystems beteiligt sein müssen.

Neben den chemotaktisch wirkenden Komplementkomponenten war ebenso eine Beteiligung von Formylmethionylpeptiden, wie z. B. FMLP, an der Mykoplasmen-induzierten Granulozyteninfiltration möglich. Diese, im Verlauf der eubakteriellen Proteinsynthese durch Abspaltung des N-terminalen Formylmethionins entstehenden Peptide, verfügen über eine chemotaktische Aktivität gegenüber Granulozyten [159]. So konnten Colditz et al. durch die intrakutane Injektion von FMLP (10 nM) eine Akkumulation von Granulozyten in der Haut von Kaninchen induzieren. Diese erreichte nach einer Stunde ein Maximum, tendierte jedoch nach vier Stunden bereits wieder gegen Null [23]. Ribeiro et al. dokumentierten demgegenüber auch noch vier Stunden nach der ip-Applikation hoher FMLP-Dosen (10 nMol bzw. 4,4 µg pro Tier) einen signifikanten Granulozyteninflux in den Peritonealraum von Ratten [145]. Durch die Injektion von bis zu 10 µM FMLP in einen unter die Haut von Mäusen implantierten Schwamm ist nach sechs Stunden keine Infiltration von Granulozyten nachzuweisen [114].

Auch Mykoplasmen sind, ebenso wie andere Eubakterien, in der Lage, N-Formylmethionin zu synthetisieren, jedoch aufgrund ihres kleinen Genoms dabei auf das Vorhandensein von Folsäure im Kulturmedium angewiesen [110]. Da dies unter den gegebenen Kulturbedingungen der Fall war, konnte ein Mitwirken N-Formylmethionin-modifizierter Peptide an der Mykoplasmen-induzierten Granulozyteninfiltration nicht ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz zur frühen Phase war für die späte Phase der Granulozyteninfiltration die Makrophagen stimulierende Aktivität des mykoplasmalen Lipopeptids MALP-2 von entscheidender Bedeutung. So kam es 24 Stunden nach der Injektion von gelöstem MALP-2 zu einem steilen und im Zeitraum von zwei bis drei Tagen maximalen Anstieg der Granulozyten im Peritonealraum. Ein weiterer Hinweis für den Einfluß von MALP-2 auf die spät induzierte Granulozyteninfiltration ergab sich durch den Vergleich zweier *M. fermentans*-Klone, die *in vitro* über eine unterschiedlich hohe Makrophagen stimulierende Aktivität verfügten: Die Fähigkeit dieser beiden Klone, *in vivo* eine Infiltration von Granulozyten zu induzieren, stand im direkten Zusammenhang zu ihrem Makrophagen stimulierenden Potential. So führte die Injektion des *in vitro* höher aktiven Klons nach 24 Stunden zu einer deutlich stärkeren Granulozyteninfiltration als die Injektion des *in vitro* weniger aktiven Klons (siehe Abb. 19). Vier Stunden nach Applikation konnte dieser signifikante Unterschied noch nicht beobachtet werden, was darauf hinweist, daß MALP-2-unabhängige Mechanismen, wie z. B. die Aktivierung des Komplementsystems, an der frühen Phase der Infiltration von Granulozyten nach ip-Injektion hitzegetöteter Mykoplasmen beteiligt sein müssen. In Gegensatz dazu war, wie durch die ip-Injektion des gelösten MALP-2 und dem Vergleich der

beiden Klone deutlich wurde, die späte Phase der Granulozyteninfiltration direkt von der Makrophagen stimulierenden Aktivität des MALP-2 abhängig.

Mit Hilfe C5-defizienter Mäuse konnten auch Cardozo et al. eine von der Aktivierung des Komplementsystems unabhängige Infiltration von Granulozyten nach ip-Applikation von Endotoxin nachweisen. Dieselben Autoren dokumentierten darüber hinaus eine fehlende Beteiligung der Komplementkomponente C3 an der LPS-induzierten Granulozyteninfiltration in Ratten [17]. Genauso wie die MALP-2-induzierte Leukozyteninfiltration von der Makrophagen stimulierenden Aktivität dieses Lipopeptids abhängig war, kann vermutlich auch die von Cardozo et al. beschriebene und von der Aktivierung des Komplementsystems unabhängige, LPS-induzierte Leukozyteninfiltration auf das Makrophagen stimulierende Potential des Endotoxins zurückgeführt werden.

4.3 Die MALP-2-induzierte Freisetzung von Chemokinen

MALP-2, ein Lipopeptid aus der Zytoplasmamembran von *M. fermentans*, ist *in vitro* ein potenter Stimulator der Zytokinfreisetzung durch Makrophagen [126, 127, 154]. In dieser Eigenschaft ähnelt es LPS, einem Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien. LPS ist darüber hinaus in der Lage, Makrophagen zur Freisetzung von Chemokinen zu stimulieren [108, 194, 195]. Die funktionelle Ähnlichkeit von LPS und MALP-2 sowie die im Verlauf einer Infektion mit den zellwand- und somit LPS-losen Mykoplasmen in dieser Arbeit nachgewiesene (siehe 3.2.3.2) und mehrfach dokumentierte [28, 70, 101, 147, 180] Infiltration von Leukozyten am Infektionsherd, wurden daher als Hinweise auf eine MALP-2 induzierte Freisetzung von Chemokinen und eine daraus resultierende Beteiligung dieses Lipopeptid an einer Leukozytenchemotaxis gewertet. Aus diesem Grund wurde in einem *in vitro* Experiment überprüft, ob MALP-2 die Fähigkeit besitzt, eine Freisetzung von Chemokinen, speziell von MIP-1 α , MIP-2 und MCP-1, zu stimulieren. MIP-1 α , MIP-2 und MCP-1 sind drei einer Vielzahl von Chemokinen, die durch aktivierte Makrophagen synthetisiert und freigesetzt werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sich jedoch, aus in erster Linie praktischen Gründen, auf den Nachweis dieser drei Chemokine beschränkt. So waren zum einen die Nachweistests für Chemokine sehr teuer und konnten somit nicht unbegrenzt ausgeweitet werden, zum anderen war mit dem verfügbaren Probenmaterial der *in vivo* Versuche (Serum) nur eine begrenzte Anzahl an Tests durchführbar. Mit MIP-1 α , MIP-2 und MCP-1 wurden Chemokine ausgewählt, deren Wirkungsspektrum mit der beobachteten Infiltration von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen/Monozyten übereinstimmte. So zählen MIP-1 α und MCP-1 zur Gruppe der “C-C-Chemokine”, die in erster Linie chemotaktisch auf Makrophagen und Monozyten wirken, während MIP-2, ein “C-X-C-Chemokin”, chemotaktische Aktivität gegenüber Neutrophilen zeigt [zusammengefaßt in 177].

In einem Dosis-Wirkungs-Experiment konnte nachgewiesen werden, daß MALP-2 über die Fähigkeit verfügte, die Freisetzung dieser drei Chemokine durch murine Peritonealmakrophagen

zu induzieren. Bezogen auf das Gewicht (pg/ml) war MALP-2 sogar um eine Zehnerpotenz aktiver als das aus einer S-Form von *Salmonella typhimurium* isolierte LPS (siehe Abb. 16). Diese Beziehung galt gleichermaßen auch für die Freisetzung der inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α (siehe Abb. 17).

Im Hinblick auf die *in vitro* Kinetik gab es deutliche Unterschiede zwischen den drei Chemokinen (siehe Abb. 18): MIP-1 α wurde bereits nach sechs Stunden in maximalen Konzentrationen freigesetzt und fiel dann deutlich ab. MCP-1 erreichte im Gegensatz dazu erst nach 24 Stunden ein Maximum. Dieses blieb für weitere 24 Stunden stabil. MIP-2 stieg über den gesamten Untersuchungszeitraum von 48 Stunden kontinuierlich an.

Eine nach acht Stunden maximale und dann abnehmende Freisetzung von MIP-1 α wurde auch von Sprenger et al. nach Stimulation humaner Monozyten mit *Borellia burgdorferi* nachgewiesen [171]. Diese Reduktion ist vermutlich auf den enzymatischen Abbau von MIP-1 α zurückzuführen. Eine mit drei bis vier Stunden ähnlich kurze Halbwertszeit in der Zellkultur ist bereits für TNF- α beschrieben [47]. Anders als bei MIP-1 α nahm die Konzentration an freigesetztem MIP-2 und MCP-1 innerhalb von 48 Stunden nicht ab. Dies ließ vermuten, daß ein Abbau dieser beiden Chemokine nicht stattfand oder aber die Neusynthese den Abbau kompensierte. Auch Hayashi et al. wiesen eine über 48 Stunden ansteigende MCP-1-Freisetzung durch LPS-aktivierte Astrozyten nach [61].

Die *in vitro* nachgewiesene Fähigkeit von MALP-2, Makrophagen zur Freisetzung von Chemokinen zu stimulieren, ließ die Annahme zu, daß die beobachtete Infiltration von Leukozyten nach ip-Injektion MALP-2-haltiger Präparationen auf die Synthese und Freisetzung dieser Chemokine *in vivo* zurückzuführen war. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Serum bzw. Peritonealflüssigkeit der behandelten Mäuse auf das Vorhandensein von MIP-1 α , MIP-2 und MCP-1 hin untersucht (siehe 3.2.5.1). Vorab wurde ermittelt, in welcher der beiden Körperflüssigkeiten höhere Konzentrationen des jeweiligen Chemokins freigesetzt wurden. Aufgrund dieser Vorversuche (nicht gezeigt) erfolgte der Nachweis von MCP-1 und MIP-2 im Serum, der von MIP-1 α in der Peritonealflüssigkeit. Die in der Peritonealflüssigkeit höhere Konzentration an freigesetztem MIP-1 α ist u. U. darauf zurückzuführen, daß auch andere Zellen, darunter die im Peritonealraum in hoher Zahl vorkommenden B-Lymphozyten, in der Lage sind, dieses Chemokin infolge einer Stimulation zu synthetisieren [16]. Ob MALP-2 die Fähigkeit besitzt, B-Lymphozyten zur Chemokinsynthese zu aktivieren, ist im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht untersucht worden. Die Kinetik der Chemokinfreisetzung *in vivo* stimmte mit der Kinetik der Leukozyteninfiltration, dem frühen Influx von Granulozyten und der späteren Akkumulation von Makrophagen/Monozyten, weitgehend überein. So wurde das auf polymorphkernige Granulozyten chemotaktisch wirkende MIP-2 schon zwei Stunden nach der Applikation der verschiedenen MALP-2-Präparationen in maximalen Konzentrationen freigesetzt. Bereits nach sechs Stunden waren die Konzentrationen deutlich reduziert, nach 24 Stunden war nahezu kein MIP-2 mehr nachweisbar (siehe Abb. 23). Im Gegensatz zu MIP-2 konnten die u. a. auf die spät infiltrierenden Makropha-

gen/Monozyten chemotaktisch wirkenden Chemokine MIP-1 α und MCP-1 auch nach 24 Stunden noch nachgewiesen werden (siehe Abb. 22 und 24). Während jedoch das Maximum der MCP-1-Freisetzung, ähnlich wie bei MIP-2, bereits nach zwei Stunden erreicht war, wurden maximale MIP-1 α -Konzentrationen erst nach sechs Stunden bestimmt. Der drei Tage nach der Applikation MALP-2-haltiger Präparationen zu beobachtende Anstieg an Makrophagen/Monozyten (siehe Tab. 4) konnte sowohl dem chemotaktischen Potential von MIP-1 α und MCP-1 als auch der Fähigkeit von MIP-1 α , die Proliferation ausgereifter Makrophagen zu stimulieren, zugeschrieben werden [41].

Übereinstimmungen zwischen der *in vitro* und *in vivo* Kinetik der Chemokine wurden nur im Fall von MIP-1 α , nicht aber für MIP-2 bzw. MCP-1 festgestellt. Die fehlenden Übereinstimmungen waren aufgrund der unterschiedlichen Testbedingungen nicht verwunderlich. So sind die Mediatoren *in vivo* einer weitaus größeren Anzahl von Einflüssen unterworfen als *in vitro*. Zu diesen Einflüssen zählen u. a. die Verteilung des Chemokins im Organismus, die Adsorption an körpereigene Moleküle sowie der enzymatische Abbau.

Die Kinetik der Freisetzung von MIP-1 α , MIP-2 und MCP-1 war von der applizierten MALP-2-Präparation unabhängig. Im Gegensatz dazu hatte die Präparationsform jedoch einen deutlichen Einfluß auf das Ausmaß der Chemokinfreisetzung. So wurden zwei Stunden nach der Applikation von freiem MALP-2 signifikant höhere Konzentrationen an MIP-2 und MCP-1 im Serum behandelter Mäuse nachgewiesen als nach Injektion partikulärer Präparationen (siehe Abb. 23 und 24). Diese unterschiedlich hohe Chemokinfreisetzung ist vermutlich auf die systemische Wirkung des gelösten MALP-2 zurückzuführen, das schneller als partikuläres MALP-2 in die Zirkulation gelangen kann. Ob es dort auch andere Zellen als Makrophagen/Monozyten zu aktivieren vermag, ist nicht bekannt. Zumindest MCP-1 kann durch stimulierte Endothelzellen freigesetzt werden [140]. Für MIP-2 sind neben Makrophagen auch Epithelzellen als sezernierende Zellen beschrieben [36]. Warum eine im Vergleich zu *M. fermentans* und gelöstem MALP-2 deutlich höhere Freisetzung von MIP-1 α durch MALP-2-haltige Liposomen induziert wurde, konnte nicht erklärt werden. Dem Einfluß der partikulären Struktur widersprach hierbei die Tatsache, daß gelöstes MALP-2 und hitzegetötete Mykoplasmen eine Freisetzung von MIP-1 α in derselben Größenordnung auslösten (siehe Abb. 22).

Trotz einer prinzipiellen Übereinstimmung in den Kinetiken lag zwischen der Chemokinfreisetzung und der daraus resultierenden Infiltration von Leukozyten eine Zeitspanne von 20 Stunden. Diese Zeitdifferenz könnte u. a. darauf zurückzuführen sein, daß die injizierten MALP-2-Konzentrationen zu hoch dosiert waren und zu einer systemischen Freisetzung der Chemokine (MIP-2 und MCP-1) führten. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, verläuft die Infiltration von Leukozyten entlang eines Konzentrationsgradienten aus Chemokinen, die von den aktivierten Zellen am Infektionsherd freigesetzt werden, von diesen wegdiffundieren und an Heparin-haltige Proteoglykane im Gewebe sowie an Heparin-haltige, extrazelluläre Matrixproteine binden. Zirkulierende, d. h. über den gesamten Organismus verteilte Chemokine verhindern, wie von

Hechtman et al. nachgewiesen wurde [63], die Ausbildung eines solchen Gradienten und somit auch die zielgerichtete Wanderung der Leukozyten durch das Gewebe. So konnten Hechtman et al. durch die primäre iv-Applikation hoher IL-8-Konzentrationen eine durch die intradermale Injektion inflammatorischer Mediatoren (z. B. LTB₄, C5a) induzierte Infiltration von Granulozyten am Infektionsherd inhibieren und eine Leukozytose fördern [63]. Ob auch in dieser Arbeit eine Inhibition der Chemotaxis durch die systemische Freisetzung von Chemokinen erfolgte, wurde nicht untersucht.

Ein weiterer Aspekt, der in diesem Zusammenhang beachtet werden sollte, ist, daß durch die Nachweistests nur die Moleküle erfaßt werden, die an der eigentlichen Reaktion, der Ausbildung eines Konzentrationsgradienten, nicht beteiligt, sondern im Überschuß vorhanden sind. Der fehlende Nachweis der Chemokine zu späteren Zeiten nach der Applikation von MALP-2-Präparationen stellt somit keinen direkten Beweis dafür dar, daß diese nicht mehr synthetisiert werden. So konnten Huang et al. mittels *Northern*-Technik auch 16 Stunden nach intratrachealer Applikation von LPS eine deutlich erhöhte Expression der MIP-2 mRNA in den Zellen der "Bronchoalveolar-Spülflüssigkeit" nachweisen [73]. Eine bis zu 24 Stunden nach ip-Applikation von LPS gesteigerte Expression von MIP-1 α mRNA im Lungenhomogenisat dokumentierten Standiford et al. [173].

MIP-1 α , MIP-2 und MCP-1 sind nicht die einzigen Chemokine, die durch aktivierte Makrophagen freigesetzt werden und somit an der beobachteten Infiltration von Leukozyten nach Applikation MALP-2-haltiger Präparationen beteiligt sein können. So sind neben MIP-2 auch KC, ein murines "C-X-C-Chemokin", und das u. a. auf Makrophagen/Monozyten chemotaktisch wirkende MIP-1 α in der Lage, die Infiltration neutrophiler Granulozyten zu induzieren [3, 76]. Eine Freisetzung von KC im Serum und der Peritonealflüssigkeit MALP-2 behandelter Mäuse wurde bereits nachgewiesen (U. Deiters, J. Barsig, P. F. Mühlradt, unveröffentlicht). Die Mannigfaltigkeit der an der Granulozyteninfiltration beteiligten Chemokine trug u. U. dazu bei, daß ein Versuch, diese Infiltration durch einen spezifischen Antikörper zu inhibieren, fehlschlug. So konnte durch ip-Injektion von anti-MIP-2 die MALP-2 induzierte Granulozyteninfiltration nicht reduziert werden (nicht gezeigt). Auf Versuche, die Infiltration von Granulozyten durch einen geeigneten Antikörper-Cocktail zu inhibieren, mußte aus Kostengründen verzichtet werden. Entsprechend des Granulozyteninflux wird vermutlich auch die MALP-2 induzierte Infiltration von Makrophagen/Monozyten nicht nur von MIP-1 α und MCP-1 ausgelöst, sondern ist die Folge einer Freisetzung mehrerer, auf Makrophagen/Monozyten chemotaktisch wirkender Chemokine. Auch Saukkonen et al. konnten durch die Applikation von MIP-1 bzw. MIP-2 eine Infiltration von Leukozyten induzieren, das Ausmaß einer *Streptococcus pneumoniae*-induzierten zerebrospinalen Leukozytose jedoch durch die Injektion von MIP-1- bzw. MIP-2-Antikörpern nicht beeinflussen [156]. Diese Versuche verdeutlichen, daß es sich bei der induzierten Leukozytenchemotaxis um einen komplexen Prozeß handelt, der von mehreren Faktoren, darunter verschiedenen Chemokinen, beeinflußt wird. In diesem Zusammenhang ist gleichermaßen auch die durch MALP-2

induzierte Freisetzung der Chemokine MIP-1 α , MIP-2 und MCP-1 zu sehen.

Leukotriene (z. B. LTB₄) sowie PAF sind weitere, an der beobachteten Leukozyteninfiltration potentiell beteiligte Faktoren, die von aktivierten Makrophagen freigesetzt werden können und die über ein chemotaktisches Potential verfügen. So wiesen Ribeiro et al. vier Stunden nach ip-Injektion von LTB₄ (3,4 μ g) einen signifikanten Anstieg an Neutrophilen im Peritonealraum von Ratten nach [145]. Einen solchen beobachteten auch Griswold et al. zwei Stunden nach der ip-Injektion von 250 ng LTB₄ in Mäuse [54]. Im Gegensatz dazu konnten Sayers et al. eine Infiltration polymorphkerniger Granulozyten zwei Stunden nach der Applikation von bis zu 50 ng LTB₄ in den Peritonealraum von Mäusen nicht feststellen [157]. Die chemotaktische Aktivität von PAF wurde von Colditz et al. nachgewiesen: Durch intrakutane Injektion von 10 μ M PAF in Kaninchen ist ein Maximum der Granulozytenakkumulation in der Haut nach zwei Stunden erreicht. Bereits eine Stunde später liegt die Konzentration der Granulozyten auf Kontrollniveau [23]. Eine MALP-2 induzierte Freisetzung von LTB₄ und PAF durch aktivierte Makrophagen wurde in dieser Arbeit nicht untersucht und kann daher nicht ausgeschlossen werden. Jedoch ist eine *in vitro* Freisetzung von Prostaglandin (6-keto-PGF_{1 α}) nach MDHM-Stimulation bereits beschrieben [126]. Prostaglandine sind, ebenso wie Leukotriene, Metabolite des Arachidonsäure-Stoffwechsels.

Auch Zytokine, wie z. B. TNF- α und IL-1, können bei der MALP-2-induzierten Leukozyteninfiltration eine Rolle spielen. Zwar verfügt weder TNF- α noch IL-1 über eigene chemotaktische Fähigkeiten [157], jedoch sind beide Zytokine in der Lage, durch die Stimulation der Chemo-kinsynthese die Infiltration polymorphkerniger Granulozyten zu induzieren [114, 157]. Eine biologische Aktivität von TNF- α war zum frühesten Zeitpunkt der Untersuchungen, zwei Stunden nach Applikation, nicht mehr detektierbar. Dies könnte jedoch auf die kurze Halbwertszeit von TNF- α *in vivo* [201] zurückzuführen sein. So konnten in einem nachträglich durchgeführten Test deutlich erhöhte Serumkonzentrationen von TNF- α eine Stunde nach Applikation von gelöstem MALP-2 nachgewiesen werden (siehe 3.2.5.3). Eine MALP-2-induzierte Freisetzung von IL-1 wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Aus früheren Arbeiten mit "MDHM", einem Lipopeptidgemisch aus *M. fermentans*, ist jedoch bekannt, daß dieses in erster Linie die Synthese von zellgebundenem IL-1 induziert [126].

4.4 Endotoxintoleranz

Das Phänomen der Endotoxintoleranz, das seit mehr als hundert Jahren bekannt ist [19], beschreibt ein durch Applikation subletaler LPS-Dosen refraktäres Stadium gegenüber Endotoxin. Diese Toleranz kann in eine frühe und eine späte Phase unterteilt werden. Die frühe Phase ist durch die reduzierte Synthese und Freisetzung von Entzündungsmediatoren (z. B. TNF- α) gekennzeichnet, die späte Phase durch die Synthese O-spezifischer Antikörper [zusammengefaßt in 80]. Von großer klinischer Relevanz ist die Endotoxintoleranz u. a. im Hinblick auf eine Prophylaxe gegenüber einer Sepsis und ihren Folgeerscheinungen, wie z. B. der Schocklunge oder

dem Multiorganversagen.

Trotz der klinischen Relevanz und intensiver Forschung ist das Phänomen der Endotoxintoleranz bis heute noch nicht vollständig erforscht. Dies ist u. a. auf die Vielzahl beteiligter Mediatoren zurückzuführen, die sich untereinander in ihrer Synthese hemmen oder stimulieren können, darunter TNF- α [116], IL-1 [100], IL-6 [185] oder NO [42]. Eine Beteiligung des regulatorisch wirkenden Zytokins IL-10 an der Entwicklung einer Endotoxintoleranz wird hingegen ausgeschlossen [9]. Neben den verschiedenen Mediatoren werden auch andere Mechanismen, wie z. B. der Verlust von LPS-Rezeptoren [37] oder Veränderungen in der Zellpopulation [109] diskutiert.

Eine Endotoxintoleranz kann nicht nur durch LPS selbst, sondern ebenso durch eine Vorbehandlung mit TNF- α und/oder IL-1 erzeugt werden ("Kreuztoleranz") [27, 183]. In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob auch durch Applikation des mykoplasmaalen Lipopeptids MALP-2 eine Endotoxintoleranz induziert werden kann. Da es sich sowohl bei LPS als auch bei MALP-2 um potente Makrophagenaktivatoren handelt, war eine solche Kreuztoleranz theoretisch denkbar, jedoch nicht mit Sicherheit vorherzusagen. So konnten Roth et al. in Meerschweinchen eine durch die reduzierte Freisetzung von IL-6 bzw. TNF- α gekennzeichnete Kreuztoleranz zwischen LPS und MDP (Muramyl-dipeptid) nicht nachweisen [151]. MDP ist ein Bestandteil der Zellwand gram-positiver Bakterien, das sowohl *in vitro* [175] als auch *in vivo* [150] in der Lage ist, die Freisetzung von Zytokinen zu induzieren. Im Gegensatz dazu ist eine bestehende Kreuztoleranz zwischen Endotoxin und einer pharmazeutischen Präparation aus *Streptococcus pyogenes*, "OK-432", dokumentiert [135]. OK-432 verfügt ebenso wie MDP oder MALP-2 über die Fähigkeit, die Freisetzung von Zytokinen zu stimulieren [155].

Zum Nachweis einer MALP-2-induzierten Endotoxintoleranz erhielten NMRI-Mäuse eine primäre intraperitoneale Injektion von MALP-2, der in unterschiedlichen Zeitabständen eine sekundäre ip-Injektion von LPS folgte. Als Hinweis auf eine ausgebildete Endotoxintoleranz wurde eine im Anschluß an die sekundäre LPS-Applikation reduzierte systemische Freisetzung von TNF- α gewertet. Diese reduzierte TNF- α -Freisetzung stellt einen etablierten Parameter im Toleranzmodell dar, der bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen in einer Vielzahl von Tiermodellen dokumentiert ist [37, 44, 90, 190]. Ein weiterer Parameter ist z. B. eine herabgesetzte Letalitätsrate bei Versuchstieren, u. a. bei LPS-hochempfindlichen, D-Galaktosamin-behandelten Mäusen [46]. Da TNF- α jedoch im Endotoxinschock von zentraler Bedeutung ist und auch andere Parameter, wie die Letalitätsrate, im direkten Zusammenhang mit der freigesetzten TNF- α Konzentration zu sehen sind (siehe auch unter 1.6), wurde dieses Zytokin für den Nachweis einer MALP-2-induzierten Endotoxintoleranz ausgewählt. Die Bestimmung von TNF- α erfolgte jeweils eine Stunde im Anschluß an die sekundäre LPS-Injektion, da zu späteren Zeitpunkten ein Nachweis dieses Zytokins *in vivo* nicht mehr möglich ist [38, 201; siehe auch eigene Ergebnisse 3.2.5.3]. Versuchstiere, denen primär LPS appliziert wurde, dienten als Positivkontrollen. Sie zeigten an, ob das Testsystem funktionierte, d. h., die Zeitspannen zwischen Primär- und Sekundärinjektion

richtig gewählt und die applizierten LPS-Dosen für die Ausbildung einer Endotoxintoleranz ausreichend waren. Mäuse, die mit Kochsalzlösung vorbehandelt wurden, spiegelten demgegenüber die Reaktion nicht-toleranter Tiere auf eine LPS-Injektion wider. Die Applikation von LPS führte bei NaCl-vorbehandelten NMRI-Mäusen zu einem starken Anstieg der TNF- α -Konzentration im Serum (siehe Abb. 26 A). Eine Vorbehandlung der Versuchstiere mit LPS resultierte hingegen in einem Stadium der Toleranz gegenüber Endotoxin und äußerte sich in einer signifikant verminderten Freisetzung von TNF- α . Diese LPS-induzierte Endotoxintoleranz wurde als Hinweis darauf gesehen, daß das Versuchssystem richtig gewählt war. Das Stadium der LPS-induzierten Endotoxintoleranz begann bereits drei Stunden im Anschluß an die primäre LPS-Injektion, war jedoch auch nach 24 bzw. 72 Stunden noch nachzuweisen. Ebenso wie durch LPS konnte auch durch die Vorbehandlung der Mäuse mit MALP-2 eine reduzierte TNF- α -Freisetzung induziert werden ("Kreuztoleranz"). Sowohl die Größenordnung der freigesetzten TNF- α -Konzentrationen als auch der Zeitrahmen entsprachen dabei der LPS-induzierten Endotoxintoleranz.

Mit IL-6 wurde neben TNF- α ein weiteres proinflammatorisches Zytokin untersucht, dessen Bedeutung als Mediator bei der Entwicklung der Endotoxintoleranz jedoch noch nicht vollständig erforscht ist [44]. Im Gegensatz zur Vorbehandlung mit LPS, durch die zu allen drei Untersuchungszeitpunkten eine Endotoxintoleranz induziert werden konnte, wurde eine verminderte Freisetzung von IL-6 nach primärer Applikation von MALP-2 nur nach 24 Stunden nachgewiesen (siehe Abb. 26 B). Sowohl zum frühen (3 Stunden) als auch zum späten Untersuchungszeitpunkt (72 Stunden) zeigten NaCl- und MALP-2-vorbehandelte Mäuse keine deutlich erkennbaren Unterschiede hinsichtlich der IL-6-Freisetzung.

Die in der Maus reduzierte Freisetzung von IL-6 als Reaktion auf die wiederholte intraperitoneale Applikation subletaler Endotoxin-Dosen wurde auch von Erroi et al. [37] sowie León et al. [100] nachgewiesen. Im Gegensatz dazu konnte in Ratten durch die wiederholte iv-Injektion von LPS zwar eine herabgesetzte TNF- α -Konzentration, nicht aber eine reduzierte IL-6-Freisetzung dokumentiert werden [44].

Auffallend bei den in dieser Arbeit durchgeführten Toleranzversuchen waren die stark voneinander abweichenden Reaktionen der individuellen Mäuse auf die Injektion. Wie bereits unter 3.2.6 dargelegt, wiesen zwei von 18 Kontrolltieren (Primärinjektion: NaCl-Lösung, Sekundärinjektion: 1 μ g LPS) weder erhöhte TNF- α -, noch erhöhte IL-6-Konzentrationen auf. Das vollständige Ausbleiben einer Reaktion konnte nicht abschließend geklärt werden. Neben einer mißglückten Injektion wurde ein bereits bestehender Toleranzstatus der frühen Phase in Betracht gezogen. Da die Tiere weder vom Züchter noch im hiesigen Institut steril gehalten wurden, war die Möglichkeit einer bestehenden Infektion und somit einer Toleranz der frühen Phase durchaus gegeben. Im Gegensatz dazu wurde eine Toleranz der späten Phase, die Wochen bis Monate andauern kann, als unwahrscheinlich betrachtet, da sie von der Synthese O-spezifischer Antikörper abhängig ist und eine Infektion der Tiere mit dem gleichen Bakterienstamm erfordern würde, aus dem das

injizierte LPS gewonnen wurde [80].

Bei vier weiteren, NaCl-vorbehandelten Kontrolltieren konnte darüber hinaus zwar eine erhöhte IL-6-Konzentration, jedoch kein Anstieg bezüglich der TNF- α -Freisetzung nachgewiesen werden. Dies wurde als ein Hinweis darauf gewertet, daß die Freisetzung von IL-6 und TNF- α unabhängig voneinander reguliert wird. Die unterschiedliche Regulation der TNF- α - und IL-6-Synthese durch MDHM-stimulierte Makrophagen wurde bereits dokumentiert [47]. Gestützt wurde diese Annahme auch dadurch, daß die TNF- α - und IL-6-Freisetzung nach Vorbehandlung mit MALP-2 und sekundärer Applikation von LPS unterschiedlich verlief: Während die durch MALP-2 induzierte Reduktion der TNF- α -Freisetzung bereits nach drei Stunden einsetzte und auch nach 24 und 72 Stunden noch anhielt, war, wie bereits erwähnt, die IL-6-Freisetzung lediglich nach 24 Stunden verringert (siehe Abb. 26 B). Im Gegensatz dazu wies die IL-6- und TNF- α -Freisetzung nach Vorbehandlung mit LPS keine Unterschiede auf. Daraus konnte gefolgert werden, daß LPS und MALP-2 über verschiedene Wege der Signaltransduktion verfügten. Eine unterschiedliche Regulation der Zytokinfreisetzung in LPS-toleranten Mäusen wurde auch von Erroi et al. dokumentiert [37]. Sie konnten durch Injektion von PMA (Phorbol 12-Myristat 13-Azetat), einem Aktivator der Proteinkinase C, die reduzierte IL-6-Freisetzung in LPS-toleranten Mäusen aufheben. Im Gegensatz dazu blieb die durch wiederholte Applikation von LPS herabgesetzte TNF- α -Freisetzung unbeeinflusst.

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, daß MALP-2 die prinzipielle Fähigkeit besitzt, eine Toleranz gegenüber Endotoxin zu induzieren. Versuche allerdings, die Regulation der Zytokinfreisetzung bzw. die Signaltransduktionswege von LPS und MALP-2 in der Endotoxintoleranz zu untersuchen, konnten aus Zeitmangel nicht durchgeführt werden. Auf eine Diskussion dieser Punkte, die aufgrund der fehlenden Untersuchungen sowie der Komplexität des Phänomens einen rein spekulativen Charakter hätte, wird daher verzichtet.

4.5 Ausblick

Das mykoplasmale Lipopeptid MALP-2 ist *in vivo*, wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ein potenter Stimulator der unspezifischen Immunabwehr. Dies äußerte sich u. a. in einer Freisetzung von Zyto- und Chemokinen durch aktivierte Makrophagen.

Wie bereits unter 4.4 erläutert, kann durch die Vorbehandlung mit MALP-2 eine durch die reduzierte Freisetzung von TNF- α gekennzeichnete Endotoxintoleranz induziert werden. Die daran beteiligten Mechanismen konnten aus Zeitmangel nicht weiter untersucht werden. Um das Phänomen der MALP-2-induzierten Endotoxintoleranz verstehen und eventuell nutzen zu können, wäre eine Erforschung dieser Mechanismen jedoch notwendig. Eine potentielle Anwendung wäre in einer prophylaktischen Applikation von MALP-2 zur Vermeidung eines septischen Schocks zu sehen.

Eine weitere klinische Anwendungsmöglichkeit von MALP-2 ist der Einsatz dieses Lipopeptids zur Beschleunigung einer verzögerten Wundheilung. Diese Möglichkeit begründet sich auf der hier nachgewiesenen Fähigkeit von MALP-2, *in vivo* die Freisetzung von Chemokinen zu induzieren. Zu diesen Chemokinen zählen die u. a. auf Makrophagen/Monozyten chemotaktisch wirkenden β -Chemokine MIP-1 α und MCP-1. Da Makrophagen eine wichtige Quelle für Wachstumsfaktoren darstellen, die für die Wundheilung von essentieller Bedeutung sind, wie z. B. PDGF (*platelet-derived growth factor*) oder TGF (*transforming growth factor*)- β ist eine Wundheilung ohne Makrophagen nicht möglich [98].

Erste Vorversuche, in denen MALP-2 intrakutan in die Rückenhaut von NMRI-Mäusen injiziert wurde, waren vielversprechend und zeigten, daß MALP-2 auch dort wirkt, wo es bei Wundheilungsexperimenten appliziert werden soll. So konnte drei Tage nach der Injektion von gelöstem sowie Liposomen-inkorporiertem MALP-2 eine deutliche Akkumulation von Leukozyten in der Haut nachgewiesen werden. Diese war sowohl nach Injektion von Kontroll-Liposomen als auch nach Injektion von 10 % (v/v) 2-Propanol in NaCl nicht detektierbar. Sechs Tage nach der Applikation von MALP-2 wurden erste Gefäßeinsprossungen sichtbar (U. Deiters, P. F. Mühlradt, unveröffentlicht).

Die Anwendung von MALP-2 in der Wundheilung ist von der GBF als Patent angemeldet (P. F. Mühlradt & U. Deiters, DE 198 22 820.1).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war der Nachweis einer *in vivo* Aktivität von MALP-2, einem Lipopeptid aus *M. fermentans*, das *in vitro* über die Fähigkeit verfügt, Makrophagen u. a. zur Freisetzung von IL-6, TNF- α und NO zu stimulieren. MALP-2 stand dabei stellvertretend für die Vielzahl mykoplasmaaler Lipopeptide, die aufgrund des freien N-Terminus über eine vergleichbare Struktur und somit über ein ähnlich hohes Makrophagen stimulierendes Potential verfügen. Der Schwerpunkt der *in vivo* Untersuchungen lag in dem Nachweis einer möglichen Beteiligung von MALP-2 an der Infiltration von Leukozyten am Infektionsort, einem Phänomen, das bei Mykoplasmeninfektionen bereits mehrfach dokumentiert, dessen Ursache jedoch noch weitgehend unerforscht ist.

Die Fähigkeit von MALP-2, die Synthese und Freisetzung chemotaktisch aktiver Mediatoren zu induzieren, wurde zunächst in *in vitro*-Experimenten mit murinen Peritonealmakrophagen nachgewiesen. Dabei konnte MALP-2 erstmals als ein potenter Stimulator der Chemokinsynthese identifiziert werden. Mit 50 pg/ml lag die für halbmaximale Freisetzung der Chemokine MIP-1 α , MIP-2 und MCP-1 benötigte MALP-2-Konzentration sogar um eine Zehnerpotenz niedriger als die erforderliche Konzentration an LPS.

Für die *in vivo* Untersuchungen wurde MALP-2, das natürlicherweise in der mykoplasmaalen Zytoplasmamembran integriert ist, mit hoher Effizienz in Liposomen inkorporiert. Diese wurden so konstruiert, daß sie in ihrer Zusammensetzung der Membran von *M. fermentans* weitgehend ähnelten. Wie mit Hilfe des NO-Tests ermittelt werden konnte, blieb die Makrophagen stimulierende Aktivität von MALP-2 auch nach der Inkorporation in Liposomen erhalten und lag, bei gleichem Gehalt, in der Größenordnung wie die Makrophagen stimulierende Aktivität hitzegetöteter Mykoplasmen. Kontroll-Liposomen induzierten im Gegensatz dazu keine NO-Freisetzung.

Der Beweis einer *in vivo* Aktivität von MALP-2 erfolgte nach intraperitonealer Injektion verschiedener MALP-2-Präparationen in NMRI-Mäuse. Sowohl die Applikation hitzegetöteter Mykoplasmen als auch die Injektion von gelöstem und Liposomen-gebundenem MALP-2 führte zu einem über 72 Stunden andauernden Anstieg der Leukozyten im Peritonealraum. Dieser Anstieg beruhte zum einen auf der Infiltration polymorphkerniger Granulozyten, die nach 24 - 48 Stunden ein Maximum erreichte, zum anderen auf der sich daran anschließenden Infiltration von Makrophagen/Monozyten. Die Anzahl der Lymphozyten im Peritonealraum blieb demgegenüber unverändert.

Als eine Ursache für die beobachtete Leukozyteninfiltration wurden signifikant erhöhte Konzentrationen der Chemokine MIP-1 α , MIP-2 und MCP-1 im Serum und in der Peritonealflüssigkeit der MALP-2-behandelten Mäuse nachgewiesen. MCP-1 und MIP-1 α , beides u. a. auf Makrophagen/Monozyten chemotaktisch wirkende Chemokine, erreichten zwei bzw. sechs Stunden nach der Applikation maximale Konzentrationen. Diese waren auch nach 24 Stunden

noch erhöht. Von MIP-2, dem auf neutrophile Granulozyten chemotaktisch wirkendem Chemokin, wurden ebenfalls nach zwei Stunden maximale Konzentrationen freigesetzt. Nach 24 Stunden lagen diese jedoch wieder auf dem Niveau NaCl-behandelter Kontrolltiere. Neben einer gesteigerten Chemokinfreisetzung konnten auch signifikant erhöhte IL-6-Konzentrationen im Serum MALP-2 behandelter Mäuse nachgewiesen werden. Eine MALP-2 induzierte Freisetzung von TNF- α war aufgrund der geringen Halbwertszeit dieses Zytokins nach zwei Stunden nicht mehr zu ermitteln.

Nachdem die *in vivo* Aktivität von MALP-2 durch den Nachweis einer MALP-2-induzierten Freisetzung von Chemokinen und einer daraus resultierenden Leukozytenchemotaxis bewiesen war, wurde die Fähigkeit dieses Lipopeptids untersucht, eine Toleranz gegenüber Endotoxin zu induzieren. Das Phänomen der Endotoxintoleranz beschreibt ein u. a. durch die Applikation subletaler LPS-Dosen induziertes, refraktäres Stadium gegenüber Endotoxin. Charakteristisch für dieses Stadium ist die reduzierte Freisetzung von Zytokinen, darunter TNF- α , dem zentralen Mediator im Endotoxinschock.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nachgewiesen, daß MALP-2 in der Lage ist, eine solche Endotoxintoleranz zu induzieren. Die Applikation von LPS führte bei MALP-2-vorbehandelten Mäusen in einem Zeitraum von drei bis 72 Stunden zu einer reduzierten Freisetzung von TNF- α . Eine verminderte Synthese von IL-6 konnte im Gegensatz dazu nur 24 Stunden nach der Primärinjektion von MALP-2 induziert werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pober, J. S. (Eds.): Cellular and molecular immunology. W. B. Saunders Company, USA (1997) 250-277
- [2] Akira, S., Hirano, T., Taga, T., Kishimoto, T.: Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *FASEB Journal* 4 (1990) 2860-2867
- [3] Alam, R., Kumar, D., Anderson-Walters, D., Forsythe, P. A.: Macrophage inflammatory protein-1 α and monocyte chemoattractant peptide-1 elicit immediate and late cutaneous reactions and activate murine mast cells in vivo. *Journal of Immunology* 152 (1994) 1298-1303
- [4] Allen, T. M., Williamson, P., Schlegel, R. A.: Phosphatidylserine as a determinant of reticulo-endothelial recognition of liposome models of the erythrocyte surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 85 (1988) 8067-8071
- [5] Appelberg, R.: Interferon-gamma (IFN-gamma) and macrophage inflammatory proteins (MIP)-1 and -2 are involved in the regulation of the T cell-dependent chronic peritoneal neutrophilia of mice infected with mycobacteria. *Clinical and Experimental Immunology* 89 (1992) 269-273.
- [6] Arnaout, M. A.: Structure and function of the leukocyte adhesion molecule CD11/CD18. *Blood* 75 (1990) 1037-1050
- [7] Bangham, A. D., Standish, M. M., Watkins, J. C.: Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology* 13 (1965) 238-252
- [8] Baschang, G.: Muramylpeptides and lipopeptides: studies towards immunostimulants. *Tetrahedron* 45 (1989) 6331-6360
- [9] Berg, D. J., Kühn, R., Rajewsky, K., Müller, W., Menon, S., Davidson, N., Grünig, G., Rennick, D.: Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Schwartzman reaction but not endotoxin tolerance. *Journal of Clinical Investigations* 96 (1995) 2339-2347

- [10] Berg, E. L., Yoshino, T., Rott, L. S., Robinson, M. K., Warnock, R. A., Kishimoto, T. K., Picker, L. J., Butcher, E. C.: The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule-1. *Journal of Experimental Medicine* 174 (1991) 1461-1466
- [11] Beutler, B., Milsark, I. W., Cerami, A. C.: Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effects of endotoxin. *Science* 229 (1985) 869-871
- [12] Billiau, A., Heremans, H., Vandekerckhove, F., Dillen, C.: Anti-interferon- γ antibody protects mice against the generalized Schwartzman reaction. *European Journal of Immunology* 17 (1987) 1851-1854
- [13] Bodel, P., Atkins, E.: Release of endogenous pyrogen by human monocytes. *New English Journal of Medicine* 276 (1967) 1002-1008
- [14] Brouckaert, P., Spriggs, D. R., Demetri, G., Kufe, D. W., Fiers, W.: Circulating interleukin 6 during a continuous infusion of tumor necrosis factor and interferon γ . *Journal of Experimental Medicine* 169 (1989) 2257-2262
- [15] Calcutt, M. J., Kim, M. F., Karpas, A. B., Mührladt, P. F., Wise, K. S.: Differential post-translational processing confers intraspecies variation of a major surface lipoprotein and a macrophage-activating lipopeptide of *Mycoplasma fermentans*. *Infection and Immunity* 67 (1999) 760-771
- [16] Callard, R. E., Gearing, A. J. H.: *The Cytokine FactsBook* (1994) Academic Press, London, 181-184
- [17] Cardozo, C., Edelman, J., Jagirdar, J., Lesser, M.: Lipopolysaccharide-induced pulmonary vascular sequestration of polymorphonuclear leukocytes is complement independent. *American Reviews of Respiratory Diseases* 144 (1991) 173-178
- [18] Cassell, G. H., Lindsey, J. R., Overcash, R. G., Baker, H. J.: Murine mycoplasma respiratory disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 225 (1973) 395-412
- [19] Centanni, E.: Untersuchungen über das Infektionsfieber. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 20 (1894) 148-150

- [20] Chelmonska-Soyta, A., Muller, R. B., Rosendal, S.: Activation of murine macrophages and lymphocytes by *Ureaplasma diversum*. Canadian Journal of Veterinary Research 58 (1994) 275-280
- [21] Chirgwin, K. D., Cummings, M. C., De Meol, L. R., Murphy, M., McCormack, W. M.: Identification of mycoplasmas in urine of HIV-infected persons. Clinical Infectious Diseases (Suppl.) 16 (1993) 264-266
- [22] Cleavinger, C. M., Kim, F. M., Im, J. H., Wise, K. S.: Identification of mycoplasma membrane proteins by systematic *TnphoA* mutagenesis of a recombinant library. Molecular Microbiology 18 (1995) 283-293
- [23] Colditz, I. G., Movat, H. Z.: Kinetics of neutrophil accumulation in acute inflammatory lesions induced by chemotaxins and chemotaxinogens. Journal of Immunology 133 (1984) 2169-2173
- [24] Cole, B. C., Cassell, G. H.: Mycoplasma infection as models of chronic joint inflammation. Arthritis and Rheumatism 22 (1979) 1375-1380
- [25] Cole, B. C., Naot, Y., Stanbridge, E. J., Wise, K. S.: Interactions of mycoplasmas and their products with lymphoid cells *in vitro*. In: The Mycoplasmas. Volume IV: Mycoplasma pathogenicity. S. Razin, M. F. Barile (Eds.). Academic press, London (1985) 203-257
- [26] Collins, P. D., Jose, P. J., Williams, T. J.: The sequential generation of neutrophil chemoattractant proteins in acute inflammation in the rabbit *in vivo*. Journal of Immunology 146 (1991) 677-684
- [27] Cross, A. S., Sadoff, J. C., Kelly, N., Bernton, E., Gemski, P.: Pretreatment with recombinant murine tumor necrosis factor α /cachectin and murine interleukin 1α protects mice from lethal bacterial infection. Journal of Experimental Medicine 169 (1989) 2021-2027
- [28] Dagnall, G. J. R.: Experimental infection of the conjunctival sac of lambs with *Mycoplasma conjunctivae*. British Veterinary Journal 149 (1993) 429-435
- [29] Deutsch, J., Salman, M., Rottem, S.: An unusual polar lipid from the cell membrane of *Mycoplasma fermentans*. European Journal of Biochemistry 227 (1995) 897-902

- [30] Devine, D. V., Wong, K., Serrano, K., Chonn, A., Cullis, P. R.: Liposome-complement interactions in rat serum: implications for liposome survival studies. *Biochimica et Biophysica Acta* 1191 (1994) 43-51
- [31] Dinarello, C. A., Wolf, S. M.: Exogenous pyrogens. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, Volume 60, Pyretics and Antipyretics. A. I. Milton (Ed.), Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1982) 73-112
- [32] Dinarello, C. A., Cannon, J. G., Wolff, S. M., Bernheim, H. A., Beutler, B., Cerami, A., Figari, I. S., Palladino, M. A. Jr., O'Connor, J. V.: Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *Journal of Experimental Medicine* 163 (1986) 1433-1450
- [33] Dinarello, C. A.: Endogenous pyrogens. *Methods in Enzymology* 163 (1988) 495-510
- [34] Dinarello, C. A.: Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 77 (1991) 1627-1652
- [35] Doherty, N. S., Griffiths, R. J., Hakkinen, J. P., Scampoli, D. N., Milici, A. J.: Post-capillary venules in the "milky spots" of the greater omentum are the major site of plasma protein and leukocyte extravasation in rodent models of peritonitis. *Inflammation Research* 44 (1995) 169-177
- [36] Driscoll, K. E., Hassenbein, D. G., Carter, J., Poynter, J., Asquith, T. N., Grant, R. A., Whitten, J., Purdon, M. P., Takigiku, R.: Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: Expression by rat alveolar macrophages, fibroblasts, and epithelial cells and in rat lung after mineral dust exposure. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 8 (1993) 311-318
- [37] Erroi, A., Fantuzzi, G., Mengozzi, M., Sironi, M., Orencole, S. F., Clark, B. D., Dinarello, C. A., Isetta, A., Gnocchi, P., Giovarelli, M., Ghezzi, P.: Differential regulation of cytokine production in lipopolysaccharide tolerance in mice. *Infection and Immunity* 61 (1993) 4356-4359
- [38] Evans, G. F., Zuckerman, S. H.: Glucocorticoid-dependent and -independent mechanisms involved in lipopolysaccharide tolerance. *European Journal of Immunology* 21 (1991) 1973-1979
- [39] Ezekowitz, R. A. B., Austyn, J., Stahl, P. D., Gordon, S.: Surface properties of *Bacillus calmette-guérin*-activated mouse macrophages. *Journal of Experimental Medicine* 154 (1981) 60-76

- [40] Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., Henson, P. M.: Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *Journal of Immunology* 148 (1992) 2207-2216
- [41] Fahey III, T. J., Tracey, K. J., Tekamp-Olson, P., Cousens, L. S., Jones, W. G., Shires, G. T., Cerami, A., Sherry, B.: Macrophage inflammatory protein 1 modulates macrophage function. *Journal of Immunology* 148 (1992) 2764-2769
- [42] Fahmi, H., Charon, D., Mondange, M., Chaby, R.: Endotoxin-induced desensitization of mouse macrophages is mediated in part by nitric oxide production. *Infection and Immunity* 63 (1995) 1863-1869
- [43] Fearon, D. T.: Cellular receptors for the third component of complement. *Immunology Today* 5 (1984) 105-110
- [44] Flohé, S., Heinrich, P. C., Schneider, J., Wendel, A., Flohé, L.: Time course of IL-6 and TNF α release during endotoxin-induced endotoxin tolerance in rats. *Biochemical Pharmacology* 41 (1991) 1607-1614
- [45] Fraser, C. M., Gocayne, J. D., White, O., Adams, M. D., Clayton, R. A., Fleischmann, R. D., Bult, C. J., Kerlavage, A. R., Sutton, G., Kelley, J. M., Fritchman, J. L., Weidman, J. F., Small, K. V., Sandusky, M., Fuhrmann, J., Nguyen, D., Utterback, T. R., Saudek, D. M., Phillips, C. A., Merrick, J. M., Tomb, J.-F., Dougherty, B. A., Bott, K. F., Hu, P.-C., Lucier, T. S., Petterson, S. N., Smith, H. O., Hutchison III., C. A., Venter, J. C.: The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 270 (1995) 397-403
- [46] Freudenberg, M. A., Galanos, C.: Tumor necrosis factor alpha mediates lethal activity of killed gram-negative and gram-positive bacteria in D-galactosamine-treated mice. *Infection and Immunity* 59 (1991) 2110-2115
- [47] Frisch, M.: Mykoplasma-Lipopeptid-abhängige Modulation der MHC Klasse II-Expression und Signaltransduktion bei Makrophagen. Dissertation (1996) Universität Hannover
- [48] Frisch, M., Gradehand, G., Mühlradt, P. F.: *Mycoplasma fermentans*-derived lipid inhibits class II major histocompatibility complex expression without mediation by interleukin-6, interleukin-10, tumor necrosis factor, transforming growth factor- β , type I interferon, prostaglandins or nitric oxide. *European Journal of Immunology* 26 (1996) 1050-1057

- [49] Gallily, R., Salman, M., Tarshis, M., Rottem, S.: *Mycoplasma fermentans* (incognitus strain) induces TNF α and IL-1 production by human monocytes and murine macrophages. *Immunology Letters* 34 (1992) 27-30
- [50] Gamble, J. R., Harlan, J. M., Klebanoff, S. J., Vadas, M. A.: Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 82 (1985) 8667-8671
- [51] Geary, S. J., Tourtellotte, M. E., Cameron, J. A.: Inflammatory toxin from *Mycoplasma bovis*: Isolation and characterization. *Science* 212 (1981) 1032-1033
- [52] Ginsberg, M. H., Du, X., Plow, E. F.: Inside-out integrin signalling. *Current Opinion in Cell Biology* 4 (1992) 766-771
- [53] Gorski, F., Brecht, W.: Studies on the adherence mechanisms of *Mycoplasma pneumoniae*. *FEMS Microbiology Letters* 1 (1977) 265-267
- [54] Griswold, D. E., Webb, E. F., Hillegass, L. M.: Induction of plasma exudation and inflammatory cell infiltration by leukotriene C4 and leukotriene B4 in mouse peritonitis. *Inflammation* 15 (1991) 251-258.
- [55] Haelens, A., Wuyts, A., Proost, P., Struye, S., Opdenakker, G., van Damme, J.: Leukocyte migration and activation by murine chemokines. *Immunobiology* 195 (1996) 499-521
- [56] Haensler, J., Schuber, F.: Preparation of neo-galactosylated liposomes and their interaction with mouse peritoneal macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta* 946 (1988) 95-105
- [57] Harwick, H. J., Kalmanson, G. M., Fox, M. A., Guze, L. B.: Mycoplasmal arthritis of the mouse: development of cellular hypersensitivity to normal synovial tissue. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 144 (1973) 561-563
- [58] Hattori, R., Hamilton, K. K., Fugate, R. D., McEver, R. P., Sims, P. J.: Stimulated secretion of endothelial von Willebrand Factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. *Journal of Biological Chemistry* 264 (1989) 7768-7771

- [59] Hauschildt, S., Hoffmann, P., Beuscher, H. U., Dufhues, G., Heinrich, P., Wiesmüller, K.-H., Jung, G., Bessler, W. G.: Activation of bone marrow-derived mouse macrophages by bacterial lipopeptide: cytokine production, phagocytosis and Ia expression. *European Journal of Immunology* 20 (1990) 63-68
- [60] Hauschildt, S., Beuscher, H. U., Jung, G., Bessler, W., Ulmer, A.: Intraperitoneal injection of synthetic bacterial lipopeptides does not cause a rise in circulating inflammatory cytokines. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 8 (1994) 77-82
- [61] Hayashi, M., Luo, Y., Laning, J., Strieter, R. M., Dorf, M. E.: Production and function of monocyte chemoattractant protein-1 and other β -chemokines in murine glial cells. *Journal of Neuroimmunology* 60 (1995) 143-150
- [62] Hébert, C., Bitangcol, R., Baker, J.: Scanning mutagenesis of interleukin-8 identifies a cluster of residues required for receptor binding. *Journal of Biological Chemistry* 266 (1991) 18989-18994
- [63] Hechtman, D. H., Cybulsky, M. I., Fuchs, H. J., Baker, J. B., Gimbrone, M. A., Jr.: Intravascular IL-8. Inhibitor of polymorphonuclear leukocyte accumulation at sites of acute inflammation. *Journal of Immunology* 147 (1991) 883-892
- [64] Heinzel, F. P.: The role of IFN- γ in the pathology of experimental endotoxemia. *Journal of Immunology* 145 (1990) 2920-2924
- [65] Henrich, B., Feldman, R.-C., Hadding, U.: Cytadhesins of *Mycoplasma hominis*. *Infection and Immunity* 61 (1993) 2945-2951
- [66] Hestdal, K., Ruscetti, F. W., Ihle, J. N., Jacobsen, S. E. W., Dubois, C. M., Kopp, W. C., Longo, D. L., Keller, J. R.: Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *Journal of Immunology* 147 (1991) 22-28
- [67] Himmelreich, R., Hilbert, H., Plagens, H., Pirkel, E., Li, B.-C., Herrmann, R.: Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Research* 24 (1996) 4420-4449
- [68] Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakajima, K., Koyama, K., Iwamatsu, A., Tsunasawa, S., Sakiyama, F., Matsui, H., Takahara, Y., Taniguchi, T., Kishimoto, T.: Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324 (1986) 73-76

- [69] Hoffmann, P., Heinle, S., Schade, U. F., Loppnow, H., Ulmer, A. J., Flad, H.-D., Jung, G., Bessler, W.: Stimulation of human and murine adherent cells by bacterial lipoprotein and synthetic lipopeptide analogues. *Immunobiology* 177 (1988) 158-170
- [70] Howard, C. J., Anderson, J. C., Gourlay, R. N., Taylor-Robinson, D.: Production of mastitis in mice with human and bovine ureaplasmas (T-Mycoplasmas). *Journal of Medical Microbiology* 8 (1975) 523-529
- [71] Howard, C. J., Taylor, G.: Variation in the virulence of strains of *Mycoplasma pulmonis* related to susceptibility to killing by macrophages *in vivo*. *Journal of General Microbiology* 114 (1979) 289-294
- [72] Howard, C. J., Taylor, G.: Interaction of mycoplasmas and phagocytes. *Yale Journal of Biology and Medicine* 56 (1983) 643-648
- [73] Huang, S., Paulauskis, J. D., Godleski, J. J., Kobzik, L.: Expression of macrophage inflammatory protein-2 and KC mRNA in pulmonary inflammation. *American Journal of Pathology* 141 (1992) 981-988
- [74] Ibelgaufts, H. (Ed.): Dictionary of cytokines. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (1995) 19-23
- [75] Imamura, T., Toyoshima, S., Osawa, T.: Lectin-like molecules on the murine macrophage cell surface. *Biochimica et Biophysica Acta* 805 (1984) 234-244
- [76] Introna, M., Bast, R. C., Jr., Tannenbaum, C. S., Hamilton, T. A., Adams, D. O.: The effect of LPS on expression of the early "competence" genes JE and KC in murine peritoneal macrophages. *Journal of Immunology* 138 (1987) 3891-3896
- [77] Issekutz, A. C., and Bhimji, S.: Role for endotoxin in the leukocyte infiltration accompanying *Escherichia coli* inflammation. *Infection and Immunity* 36 (1982) 558-566
- [78] Janeway, A. J., Travers, P.: Immunobiologie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford (1995)
- [79] Jesmok, G., Lindsey, C., Duerr, M., Fournel, M., Emerson, T., Jr.: Efficacy of monoclonal antibody against human recombinant tumor necrosis factor in *E. coli*-challenged swine. *American Journal of Pathology* 141 (1992) 1197-1207

- [80] Johnston, C. A., Greisman, S. E.: Mechanisms of endotoxin tolerance. In: Handbook of endotoxin. Volume 2: Pathophysiology of endotoxin. L. B. Hinshaw (Ed.), Elsevier Science Publishers B. V. (1985) 359-401
- [81] Jones, E., Stuart, D., Walker, N.: Structure of tumor necrosis factor. *Nature* 338 (1989) 225-228
- [82] Juliano, R. L., Stamp, D.: The effect of particle size and charge on the clearance rate of liposomes and liposome encapsulated drugs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 63 (1975) 651-658
- [83] Kalmar, J. R., van Dyke, T. E.: Effect of bacterial products on neutrophil chemotaxis. *Methods in Enzymology* 236 (1985) 58-87
- [84] Keller, R., Fischer, W., Keist, R., Bassetti, S.: Macrophage response to bacteria: induction of marked secretory and cellular activities by lipoteichoic acids. *Infection and Immunity* 60 (1992) 3664-3672
- [85] Kempka, G., Kolb-Bachofen, V.: Galactose-specific receptors on liver cells: Hepatocyte and liver macrophage receptors differ in their membrane anchorage. *Biochimica et Biophysica Acta* 847 (1985) 108-114
- [86] Kennedy, S., Ball, H. J.: Pathology of experimental *Ureaplasma* mastitis in ewes. *Veterinary Pathology* 24 (1987) 302-307
- [87] Kirchhoff, H., Maass, C., Runge, M., Franz, B., Schmidt, R., Quentmeier, H., Mühlradt, P. F.: Tetrazolium [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide] reduction by mycoplasmas. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42 (1992) 506-508
- [88] Kishimoto, T. K., Larson, R. S., Corbi, A. L., Dustin, M. L., Staunton, D. E., Springer, T. A.: The leukocyte integrins: LFA-1, Mac-1, and P150,95. *Advances in Immunology* 46 (1989) 149-182
- [89] Kita, M., Ohmoto, Y., Hirai, Y., Yamaguchi, N., Imanishi, J.: Induction of cytokines in human peripheral blood mononuclear cells by mycoplasmas. *Microbiology Immunology* 36 (1992) 507-516

- [90] Klosterhalfen, B., Hörstmann-Jungemann, K., Vogel, P., Flohé, S., Offner, F., Kirkpatrick, C. J., Heinrich, P. C.: Time course of various inflammatory mediators during recurrent endotoxemia. *Biochemical Pharmacology* 43 (1992) 2103-2109
- [91] Kohler, J., Heumann, D., Garotta, G., LeRoy, D., Bailat, S., Barras, C., Baumgartner, J.-D., Glauser, M. P.: IFN- γ involvement in the severity of gram-negative infections in mice. *Journal of Immunology* 151 (1993) 916-921
- [92] Lai, W. C., Linton, G., Benett, M., Pakes, S. P.: Genetic control of resistance to *Mycoplasma pulmonis* infection in mice. *Infection and Immunity* 61 (1993) 4615-4621
- [93] Laible, N. J., Germaine, G. R.: Bactericidal activity of human lysozyme, muramidase-inactive lysozyme, and cationic polypeptides against *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus faecalis*: inhibition by chitin oligosaccharides. *Infection and Immunity* 48 (1985) 720-728
- [94] Larsen, E., Palabrica, T., Sajer, S., Gilbert, G. E., Wagner, D. D., Furie, B. C., Furie, B.: PADGEM-dependent adhesion of platelets to monocytes and neutrophils is mediated by a lineage-specific carbohydrate, LNF III (CD15). *Cell* 63 (1990) 467-474
- [95] Lawrence, M. B., Springer, T. A.: Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 65 (1991) 859-873
- [96] Le, J., Vilcek, J.: Biology of disease. Interleukin 6: A multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein response. *Laboratory Investigation* 61 (1989) 588-602
- [97] Lee, K.-D., Hong, K., Papahadjopoulos, D.: Recognition of liposomes by cells: in vitro binding and endocytosis mediated by specific lipid headgroups and surface charge density. *Biochimica et Biophysica Acta* 1103 (1992) 185-197
- [98] Leibovich, S. J., Ross, R.: The role of macrophages in repair: a study with hydrocortisone and anti-macrophage serum. *American Journal of Pathology* 78 (1975) 71-100
- [99] Lemaître, M., Hénin, Y., Destouesse, F., Ferrieux, C., Montagnier, L., Blanchard, A.: Role of mycoplasma infection in the cytopathic effect induced by human immunodeficiency virus type I in infected cell lines. *Infection and Immunity* 60 (1992) 742-748
- [100] León, P., Redmond, H. P., Shou, J., Daly, J. M.: Interleukin 1 and its relationship to endotoxin tolerance. *Archives of Surgery* 127 (1992) 146-151

- [101] Lindsey, J. R., Cassell, G. H.: Experimental *Mycoplasma pulmonis* infection in pathogen-free mice. *American Journal of Pathology* 72 (1973) 63-90
- [102] Lipman, R. P., Clyde, W. A.: The interrelationship of virulence, cytoadsorption and peroxide formation in *Mycoplasma pneumoniae*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine (New York)* 131 (1969) 1163-1167
- [103] Lo, S.-C., Hayes, M. M., Kotani, H., Pierce, P. F., Wear, D. J., Newton III, P. B., Tully, J. G., Shih, J. W.: Adhesion onto and invasion into mammalian cells by *Mycoplasma penetrans*: a newly isolated mycoplasma from patients with AIDS. *Modern Pathology* (1993) 276-280
- [104] Loewenstein, J., Rottem, S., Gallily, R.: Induction of macrophage-mediated cytolysis of neoplastic cells by mycoplasmas. *Cellular Immunology* 77 (1983) 290-297
- [105] Loos, M., Brunner, H.: Complement components (C1, C2, C3, C4) in bronchial secretions after intranasal infection of guinea pigs with *Mycoplasma pneumoniae*: dissociation of unspecific and specific defense mechanisms. *Infection and Immunity* 25 (1979) 583-585
- [106] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193 (1951) 265-275
- [107] Lowry, O. H., Roberts, N. R., Leiner, K. Y., Wu, M. L., Farr, A. L.: The quantitative histochemistry I. Chemical methods. *Journal of Biological Chemistry* 207 (1954) 1-17
- [108] Luo, Y., Laning, J., Hayashi, M., Hancock, P. R., Rollins, B., Dorf, M. E.: Serologic analysis of the mouse β chemokine JE/monocyte chemoattractant protein-1. *Journal of Immunology* 153 (1994) 3708-3716
- [109] Madonna, G. S., Vogel, S. N.: Early endotoxin tolerance is associated with alterations in bone marrow-derived macrophage precursor pools. *Journal of Immunology* 135 (1985) 3763-3771
- [110] Maniloff, J.: Evolution of wall-less procaryotes. *Annuals Reviews in Microbiology* 37 (1983) 477-499
- [111] Mårdh, P.-A., Weström, L.: Antibodies to *Mycoplasma hominis* in patients with genital infection and in healthy controls. *British Journal of Venereal Diseases* 46 (1970) 390-397

- [112] Marletta, M. A., Yoon, P. S., Iyengar, R., Leaf, C. D., Wishnok, J. S.: Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 27 (1988) 8706-8711
- [113] Marshall, A. J., Miles, R. J., Richards, L.: The phagocytosis of mycoplasmas. *Journal of Medical Microbiology* 43 (1995) 239-250
- [114] Mason, M. J., van Epps, D. E.: In vivo neutrophil emigration in response to interleukin-1 and tumor necrosis factor- α . *Journal of Leukocyte Biology* 45 (1989) 62-68
- [115] Matsumoto, M., Nishiguchi, M., Kikkawa, S., Nishimura, H., Nagasawa, S., Seya, T.: Structural and functional properties of complement-activating protein M161Ag, a *Mycoplasma fermentans* gene product that induces cytokine production by human monocytes. *Journal of Biological Chemistry* 273 (1998) 12407-12414
- [116] Matsuura, M., Galanos, C.: Induction of hypersensitivity to endotoxin and tumor necrosis factor by sublethal infection with *Salmonella typhimurium*. *Infection and Immunity* 58 (1990) 935-937
- [117] May, L. T., Ghrayeb, J., Santhanam, U., Tatter, S. B., Sthoeger, Z., Helfgott, D. C., Chiorazzi, N., Grieninger, G., Sehgal, P. B.: Synthesis and secretion of multiple forms of β_2 -interferon/B-cell differentiation factor 2/hepatocyte-stimulating factor by human fibroblasts and monocytes. *Journal of Biological Chemistry* 263 (1988) 7760-7766
- [118] McEver, R. P., Beckstead, J. H., Moore, K. L., Marshall-Carlson, L., Bainton, D. F.: GMP-140, a platelet α -granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *Journal of Clinical Investigation* 84 (1989) 92-99
- [119] Melchers, F., Braun, V., Galanos, C.: The lipoprotein of the outer membrane of *Escherichia coli*: a B-lymphocyte mitogen. *Journal of Experimental Medicine* 142 (1975) 473-482
- [120] Meltzer, M. S.: Peritoneal mononuclear phagocytes from small animals. In: *Methods for studying mononuclear phagocytes*. D. O. Adams, P. J. Edelson, H. Koren (Eds.), Academic Press (1981) 63-67
- [121] Merck, E. (Ed.): *Klinisches Labor*, 12. Auflage, Merck Darmstadt: (1974) 18-21
- [122] Miles, R. J., Taylor, R. R., Varsani, H.: Oxygen uptake and H_2O_2 production by fermentative *Mycoplasma* spp.. *Journal of Medical Microbiology* 34 (1991) 219-223

- [123] Mitov, I. G., Kropec, A., Benzing, A., Just, H., Garotta, G., Galanos, C., Freudenberg, M.: Differential cytokine production in stimulated blood cultures from intensive care patients with bacterial infections. *Infection* 25 (1997) 206-212
- [124] Mizel, S. B., Oppenheim, J. J., Rosenstreich, D. L.: Characterization of lymphocyte-activating factor (LAF) produced by a macrophage cell line, P388D1. II. Biochemical characterization of LAF induced by activated T cells and LPS. *Journal of Immunology* 120 (1978) 1504-1508
- [125] Moeller, G. R., Terry, L., Snyderman, R.: The inflammatory response and resistance to endotoxin in mice. *Journal of Immunology* 120 (1978) 116-123
- [126] Mühlradt, P. F., Schade, U.: MDHM, a macrophage-stimulatory product of *Mycoplasma fermentans*, leads to in vitro interleukin-1 (IL-1), IL-6, tumor necrosis factor, and prostaglandin production and is pyrogenic in rabbits. *Infection and Immunity* 59 (1991) 3969-3974
- [127] Mühlradt, P. F., Frisch, M.: Purification and partial biochemical characterization of a *Mycoplasma fermentans*-derived substance that activates macrophages to release nitric oxide, tumor necrosis factor, and interleukin-6. *Infection and Immunity* 62 (1994) 3801-3807
- [128] Mühlradt, P. F., Kieß, M., Meyer, H., Süßmuth, R., Jung, G.: Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from *M. fermentans* acting at picomolar concentration. *Journal of Experimental Medicine* 185 (1997) 1951-1958
- [129] Mühlradt, P. F., Kiess, M., Meyer, H., Süßmuth, R., Jung, G.: Structure and specific activity of macrophage-stimulating lipopeptides from *M. hyorhinis*. *Infection and Immunity* 66 (1998) 4804-4810
- [130] Muller, W. A., Weigl, S. A., Deng, X., Phillips, D. M.: PECAM-1 is required for trans-endothelial migration of leukocytes. *Journal of Experimental Medicine* 178 (1993) 449-460
- [131] Munro, J. M., Lo, S. K., Corless, C., Robertson, M. J., Lee, N. C., Barnhill, R. L., Weinberg, D. S., Bevilacqua, M. P.: Expression of sialyl-Lewis^x, an E-selectin ligand, in inflammation, immune processes, and lymphoid tissues. *American Journal of Pathology* 141 (1992) 1397-1408
- [132] Natanson, C., Eichenholz, P. W., Danner, R. L., Eichacker, P. Q., Hoffman, W. D., Kuo, G. C., Banks, S. M., MACVittie, T. J., Parrillo, J. E.: Endotoxin and tumor necrosis factor challenges in dogs simulate the cardiovascular profile of human septic shock. *Journal of Experimental Medicine* 169 (1989) 823-832

- [133] Neimark, H. C., Lange, C. S.: Pulse-field electrophoresis indicates full-length mycoplasma chromosomes range widely in size. *Nucleic Acids Research* 18 (1990) 5443-5448
- [134] New, R. R. C.: Preparation of liposomes. In: *Liposomes: a practical approach*. R. R. C. New (Ed.), Information press Ltd., Oxford, England (1990) 33-104
- [135] Nose, M., Uzawa, A., Nomura, M., Ikarashi, Y., Nakata, Y., Akashi, M., Suzuki, G.: Control of endotoxin shock by the dried preparation of low virulent *Streptococcus pyogenes* OK-432. *Cellular Immunology* 188 (1998) 97-104
- [136] Paolini, J. F., Willard, D., Consler, T., Luther, M., Krangel, M. S.: The chemokine IL-8, monocyte chemoattractant protein-1, and I-309 are monomers at physiologically relevant concentrations. *Journal of Immunology* 153 (1994) 2704-2717
- [137] Patel, H. M., Tuzel, N. S., Ryman, B. E.: Inhibitory effect of cholesterol on the uptake of liposomes by liver and spleen. *Biochimica et Biophysica Acta* 761 (1983) 142-151
- [138] Parker, R. F., Davis, J. K., Blalock, D. K., Thorp, R. B., Simecka, J. W., Cassell, G. H.: Pulmonary clearance of *Mycoplasma pulmonis* in C57BL/6N and C3H/HeN mice. *Infection and Immunity* 55 (1987) 2631-2635
- [139] Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.-Y., van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., Beutler, B.: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in *Tlr4* gene. *Science* 282 (1998) 2085-2088
- [140] Proost, P., Wuyts, A., van Damme, J.: Human monocyte chemotactic proteins-2 and -3: structural and functional comparison with MCP-1. *Journal of Leukocyte Biology* 59 (1996) 67-74
- [141] Quentmeier, H., Schmitt, E., Kirchhoff, H., Grote, W., Mührladt, P. F.: *Mycoplasma fermentans*-derived high-molecular-weight material induces interleukin-6 release in cultures of murine macrophages and human monocytes. *Infection and Immunity* 58 (1990) 1273-1280
- [142] Radolf, J. D., Arndt, L. L., Akins, D. R., Curetty, L. L., Levi, M. E., Shen, Y., Davis, L. S., Norgard, M. V.: *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins and synthetic peptides activate monocytes/macrophages. *Journal of Immunology* 154 (1995) 2866-2877
- [143] Razin, S.: Mycoplasmas: the smallest pathogenic procaryotes. *Israel Journal of Medical Sciences* 17 (1981) 510-515

- [144] Razin, S., Yogev, D., Naot, Y.: Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. In: Microbiology and Molecular Biology Reviews 62, American Society for Microbiology (1998) 1-63
- [145] Ribeiro, R. A., Souza-Filho, M. V. P., Souza, M. H. L. P., Oliveira, S. H. P., Costa, C. H. S., Cunha, F. Q., Ferreira, S. H.: Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB₄, fMLP and C5a des arg. International Archives of Allergy and Immunology 112 (1997) 27-35
- [146] Rieber, E. P.: Grundlagen der Immunologie. In: H. W. Baenkler (ED.): Medizinische Immunologie, Band 1. (1995) 89-160
- [147] Rollins, S., Colby, T., Clayton, F.: Open lung biopsy in *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. Archives of Pathology and Laboratory Medicine 110 (1986) 34-41
- [148] Ross, R. F.: Pathogenicity of swine mycoplasmas. Annals of the New York Academy of Sciences 225 (1973) 347-368
- [149] Ross, S. E., Simecka, J. W., Gambill, G. P., Davis, J. K., Cassell, G. H.: *Mycoplasma pulmonis* possesses a novel chemoattractant for B lymphocytes. Infection and Immunity 60 (1992) 669-674
- [150] Roth, J., Hopkins, S. J., Hoadley, M. E., Tripp, A., Aslan, T., Störr, B., Luheshi, G. N., Zeisberger, E.: Fever and production of cytokines in response to single or repeat injections of muramyl-dipeptide in guinea pigs. Pflügers Archives 434 (1997) 525-533
- [151] Roth, J., Aslan, T., Störr, B., Zeisberger, E.: Lack of cross tolerance between LPS and muramyl dipeptide in induction of circulating TNF- α and IL-6 in guinea pigs. American Journal of Physiology 273 (1997) R1529-R1533
- [152] Rottem, S.: Membrane lipids of mycoplasmas. Biochimica et Biophysica Acta 604 (1980) 65-90
- [153] Ruiter, M., Wentholt, H. M. M.: Isolation of a pleuropneumonia-like organism (G-strain) in a case of fusospirillary vulvovaginitis. Acta Dermato-Venereologica 33 (1953) 123-129
- [154] Ruschmeyer, D., Thude, H., Mühlradt, P. F.: MDHM, a macrophage-activating product of *Mycoplasma fermentans*, stimulates murine macrophages to synthesize nitric oxide and become tumoricidal. FEMS Immunology and Medical Microbiology 7 (1993) 223-230

- [155] Sakano, S., Shimabukuro, T., Ohmoto, Y., Naito, K.: Cytokine-mediated antitumor effect of OK-432 on urinary bladder tumor cells in vitro. *Urological Research* 25 (1997) 239-45
- [156] Saukkonen, K., Sande, S., Cioffe, C., Wolpe, S., Sherry, B., Cerami, A., Tuomanen, E.: The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental gram-positive meningitis. *Journal of Experimental Medicine* 171 (1990) 439-448
- [157] Sayers, T. J., Wilttrout, T. A., Bull, C. A., Denn, III, A. C., Pilaro, A. M., Lokesh, B.: Effect of cytokines on polymorphonuclear neutrophil infiltration in the mouse. *Journal of Immunology* 141 (1988) 1670-1677
- [158] Schaefferbeke, T., Gilroy, C. B., Béb  ar, C., Dehais, J., Taylor-Robinson, D.: *Mycoplasma fermentans*, but not *Mycoplasma penetrans*, detected by PCR assays in synovium from patients with rheumatoid arthritis and other rheumatic disorders. *Journal of Clinical Pathology* 49 (1996) 824-828
- [159] Schiffmann, E., Corcoran, B. A., Wahl, S. A.: N-formylmethionyl peptides as chemo-attractants for leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 72 (1975) 1059-1062
- [160] Sch  bitz, B., Pezeshki, G., Probst, J. C., Reul, J. M. H. M., Skutella, T., St  hr, T., Holsboer, F., Spanagel, R.: Centrally administered oligodeoxynucleotides in rats: occurrence of non-specific effects. *European Journal of Pharmacology* 331 (1997) 97-107
- [161] Schroit, A. J., Fidler, I. J.: Effects of liposome structure and lipid composition on the activation of the tumoricidal properties of macrophages by liposomes containing muramyl dipeptide. *Cancer Research* 42 (1982) 161-167
- [162] Schroit, A. J., Galligioni, E., Fidler, I. J.: Factors influencing the *in situ* activation of macrophages by liposomes containing muramyl dipeptide. *Biology of the Cell* 47 (1983) 87-94
- [163] Shepherd, V. L.: The role of the respiratory burst of phagocytes in host defense. *Seminars in Respiratory Infections* 1 (1986) 99-106
- [164] Sher, T., Rottem, S., Gallily, R.: *Mycoplasma capricolum* membranes induce tumor necrosis factor α by a mechanism different from that of lipopolysaccharide. *Cancer Immunology Immunotherapy* 31 (1990) 86-92

- [165] Shifrine, M., Gourlay, R. N.: Serological relationship between galactans from normal bovine lung and from *Mycoplasma mycoides*. *Nature* 208 (1965) 498-499
- [166] Simecka, J. W., Davis, K. K., Davidson, M. K., Ross, S. E., Städtlander, C. T. K.-H., Cassell, G. H.: *Mycoplasma* diseases of animals. In: *Mycoplasmas: Molecular biology and pathogenesis*. J. Maniloff, R. N. McElhaney, L. R. Finch, J. B. Baseman (Eds.), American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1992) 457-471
- [167] Spanjer, H. H., Scherphof, G. L.: Targeting of lactosylceramide-containing liposomes to hepatocytes in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta* 734 (1983) 40-47
- [168] Spanjer, H. H., Morselt, H., Scherphof, G. L.: Lactosylceramide-induced stimulation of liposome uptake by kupffer cells in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta* 774 (1984) 49-55
- [169] Sparwasser, T., Miethke, T., Lipford, G., Erdmann, A., Häcker, H., Heeg, K., Wagner, H.: Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor- α -mediated shock. *European Journal of Immunology* 27 (1997) 1671-1679
- [170] Speert, D. P.: Macrophages in bacterial infection. In: C. E. Lewis, J. O'D. McGee. *The macrophage*. Oxford University Press, Oxford (1992) 215-263
- [171] Sprenger, H., Krause, A., Kaufmann, A., Priem, S., Fabian, D., Burmester, G. R., Gerns, D., Rittig, M. G.: *Borrelia burgdorferi* induces chemokines in human monocytes. *Infection and Immunity* 65 (1997) 4384-4388
- [172] Staber, F. G., Gisler, R. H., Schumann, G., Tarcsay, L., Schläfli, E., Dukor, P.: Modulation of myelopoiesis by different bacteria cell-wall components: induction of colony-stimulating activity (by pure preparations, low-molecular-weight degradation products, and a synthetic low-molecular analog of bacterial cell-wall components) in vitro. *Cellular Immunology* 37 (1978) 174-187
- [173] Standiford, T. J., Kunkel, S. L., Lukacs, N. W., Greenberger, M. J., Danforth, J. M., Kunkel, R. G., Strieter, R. M.: Macrophage inflammatory protein-1 α mediates lung leukocyte recruitment, lung capillary leak, and early mortality in murine endotoxemia. *Journal of Immunology* 155 (1995) 1515-1524
- [174] Stenberg, P. E., McEver, R. P., Shuman, M. A., Jacques, Y. V., Bainton, D. F.: A platelet α -granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *Journal of Cellular Biology* 101 (1985) 880-886

- [175] Suzuki, K., Torii, K., Hida, S., Hayashi, H., Hijama, Y., Oomoto, Y., Takii, T., Chiba, T., Onozaki, K.: Differences in interleukin 1 (IL-1), IL-6, tumor necrosis factor and IL-1 receptor antagonist production by human monocytes stimulated with muramyl dipeptide (MDP) and its stearyl derivative, romurtide. *Immunopharmacology* 28 (1994) 31-38
- [176] Taub, D. D., Lloyd, A. R., Conlon, K., Wang, J. M., Ortaldo, J. R., Harada, A., Matsushima, K., Kelvin, D. J., Oppenheim, J. J.: Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *Journal of Experimental Medicine* 177 (1993) 1809-1814
- [177] Taub, D. D., Oppenheim, J. J.: Chemokines, inflammation and the immune system. *Therapeutic Immunology* 1 (1994) 229-246
- [178] Taub, D. D.: Chemokine-leukocyte interactions. The voodoo that they do so well. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 7 (1996) 355-376
- [179] Tracey, K. J., Fong, Y., Hesse, D. G., Manogue, K. R., Lee, A. T., Kuo, G. C., Lowry, S. F., Cerami, A.: Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 330 (1987) 662-664
- [180] Tuffrey, M. A., Furr, P. M., Falder, P., Taylor-Robinson, D.: The anti-Chlamydial effect of experimental *Mycoplasma pulmonis* infection in the murine genital tract. *Journal of Medical Microbiology* 17 (1984) 357-362
- [181] Tully, J. G., Razin, S. (Eds.): Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology, Volume II. Diagnostic procedures. Academic Press, Inc., San Diego, California (1996)
- [182] Unkeless, J. C., Scigliano, E., Freedman, V. H.: Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Annuals Reviews in Immunology* 6 (1988) 251-281
- [183] Urbaschek, R., Urbaschek, B.: Tumor necrosis factor and interleukin 1 as mediators of endotoxin-induced beneficial effects. *Reviews of Infectious Diseases* 9, Suppl. 5 (1987) S607-S615
- [184] Utsugi, T., Dinney, C. P. N., Killion, J. J., Fidler, I. J.: In situ activation of mouse macrophages and therapy of spontaneous renal cell cancer metastasis by liposomes containing the lipopeptide CGP 31362. *Cancer Immunology Immunotherapy* 33 (1991) 375-381

- [185] van der Meer, J. W. M., Helle, M., Aarden, A.: Comparison of the effect of recombinant interleukin 6 and recombinant interleukin 1 on nonspecific resistance to infection. *European Journal of Immunology* 19 (1989) 413-416
- [186] van Rooijen, N., van Nieuwmegen, R., Kamperdijk, E. W. A.: Elimination of phagocytic cells in the spleen after intravenous injection of liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphate. Ultrastructural aspects of elimination of marginal zone macrophages. *Virchows Archiv / B, Cell Pathology including Molecular Pathology* 49 (1985) 375-383
- [187] Vink, A., Coulie, P. G., Wauters, P., Nordan, R. P., van Snick, J.: B cell growth and differentiation activity of interleukin-HP1 and related murine plasmacytoma growth factors. Synergy with interleukin 1. *European Journal of Immunology* 18 (1988) 607-612
- [188] Waage, A.: Production and clearance of tumor necrosis factor in rats exposed to endotoxin and dexamethason. *Clinical Immunology and Immunopathology* 45 (1987) 348-355
- [189] Waage, A., Brandtzaeg, P., Halstensen, A., Kierulf, P., Espevik, T.: The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. *Journal of Experimental Medicine* 169 (1989) 333-338
- [190] Wakabayashi, G., Cannon, J. G., Gelfand, J. A., Clark, B. D., Aiura, K., Burke, J. F., Wolff, S. M., Dinarello, C. A.: Altered interleukin-1 and tumor necrosis factor production and secretion during pyrogenic tolerance to LPS in rabbits. *American Journal of Physiology* 267 (1994) R329-R336
- [191] Walz, A., Dewald, B., von Tscharnner, V., Baggiolini, M.: Effects of the neutrophil-activating peptide NAP-2, platelet basic protein, connective tissue-activating peptide III and platelet factor 4 on human neutrophils. *Journal of Experimental Medicine* 170 (1989) 1745-1750
- [192] Westphal, O., Jann, K.: Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods in Carbohydrate Chemistry* 5 (1965) 83-91
- [193] Wise, K. S., Watson, R. K.: Antigenic mimicry of mammalian intermediate filaments by mycoplasmas. *Infection and Immunity* 48 (1985) 587-591
- [194] Wolpe, S. D., Davatelis, G., Sherry, B., Beutler, B., Hesse, D. G., Nguyen, H. T., Moldawer, L. L., Nathan, C. F., Lowry, S. F., Cerami, A.: Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *Journal of Experimental Medicine* 167 (1988) 570-581

- [195] Wolpe, S. D., Sherry, B., Juers, D., Davatelis, G., Yurt, R. W., Cerami, A.: Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86 (1989) 612-616
- [196] Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., Mathison, J. C.: CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249 (1990) 1431-1433
- [197] Xie, Q., Cho, H. J., Calaycay, J., Mumford, R. A., Swiderek, K. M., Lee, T. D., Ding, A.: Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256 (1992) 225-228
- [198] Yang, G., Coffman, F. D., Wheelock, E. F.: Characterization and purification of a macrophage-triggering factor produced in *Mycoplasma arginini*-infected L5178Y cell cultures. *Journal of Immunology* 153 (1994) 2579-2591
- [199] Yolken, R. H., Leister, F. J., Whitcomb, L. S., Santosham, M.: Enzyme immunoassays for the detection of bacterial antigens utilizing biotin-labeled antibody and peroxide biotin-avidin complex. *Journal of Immunology Methods* 56 (1983) 319-327
- [200] Zuckerman, S. H., Bendele, A. M.: Regulation of serum tumor necrosis factor in glucocorticoid-sensitive and -resistant rodent endotoxin shock models. *Infection and Immunity* 57 (1989) 3009-3013
- [201] Zuckerman, S. H., Evans, G. F., Butler, L. D.: Endotoxin tolerance: Independent regulation of interleukin-1 and tumor necrosis factor expression. *Infection and Immunity* 59 (1991) 2774-2780